



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VEICULAÇÃO MICELAR DE FÁRMACOS

Trabalho submetido por
Miguel Ramos Borges
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VEICULAÇÃO MICELAR DE FÁRMACOS

Trabalho submetido por
Miguel Ramos Borges
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Ana Isabel Henriques Dias Fernandes Pinto

novembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Quero deixar um agradecimento especial a todos aqueles que me ajudaram nesta travessia e que a tornaram mais fácil, enriquecedora e inesquecível:

Aos meus pais, pelo sacrifício que fizeram para possibilitar a minha formação e, principalmente, por toda a disponibilidade e apoio prestados, que tornaram tudo muito mais fácil.

Ao meu irmão, por, à maneira dele, nunca me deixar desanimar. Cada brincadeira e momento de descontração foram essenciais para que tudo corresse bem.

À Sofia, a minha maravilhosa companheira, pelo amor e apoio que me deu, do princípio ao fim da minha formação. Agradeço todos os momentos que passámos juntos.

À minha família, pela preocupação e por terem sempre acreditado em mim. Obrigado por estarem sempre presentes mesmo com tanta distância a separar-nos.

À Karen, por toda a força dada e todos os conselhos sábios de alguém muito importante na minha formação.

À professora Ana Isabel Fernandes, por todo o auxílio e compreensão demonstrados ao longo desta monografia. Toda a sua colaboração facilitou o meu trabalho.

Aos amigos que esta travessia me ofereceu, com quem partilhei grandes momentos e que levo comigo para a vida.

RESUMO

O cancro é uma patologia que afeta e mata uma percentagem cada vez maior da população mundial. A necessidade de recorrer à quimioterapia no tratamento da doença oncológica e a ineficácia manifestada por este tipo de terapêutica levou ao desenvolvimento de estudos com o intuito de aumentar a eficácia dos agentes quimioterapêuticos e diminuir os níveis de toxicidade associados aos mesmos.

Nesta revisão explorar-se-á a veiculação de fármacos através de micelas poliméricas, realçando as principais características e vantagens do transporte mediado por estes nanotransportadores. Para tal, serão analisadas as propriedades, a formação e a caracterização das micelas, bem como as vantagens e desvantagens associadas às mesmas. Para além disto, serão também exploradas algumas das principais aplicações dos nanotransportadores em estudo, como a utilização simultânea de vários fármacos (*multi-drug therapy*), as micelas sensíveis ao pH, as micelas sensíveis à temperatura e as micelas destinadas simultaneamente a tratamento e diagnóstico (*theranostic*), analisando as propriedades e o modo de ação de cada sistema e, apresentando alguns dados relativos a testes *in vitro* e *in vivo* realizados no âmbito da utilização das micelas no tratamento do cancro.

Palavras-Chave: Micelas | Veiculação | Vetorização | Cancro

ABSTRACT

Cancer is a disease that affects and kills a growing share of the world population. The need for chemotherapy in the treatment of oncological diseases and the inefficiency exhibited by this type of therapy led to the development of studies in order to increase the effectiveness of chemotherapeutic agents and reduce toxicity levels associated with them.

In this review we will discuss drug delivery using polymeric micelles, highlighting the main features and advantages of the transport mediated by these nanocarriers. To this end, the properties, the formation and characterization of micelles will be analysed as well as the advantages and disadvantages associated with them. In addition, the main applications of the nanocarriers under study, such as the simultaneous delivery of several drugs (multi-drug therapy), pH-sensitive micelles, thermoresponsive micelles and micelles intended for both therapy and diagnostic (theranostic) will also be presented, analysing the properties and means of action of each system and examining *in vitro* and *in vivo* data from tests carried with micelles for the treatment of cancer.

Keywords: Micelles | Drug Delivery | Targeting | Cancer

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MICELAS POLIMÉRICAS: SISTEMAS DE VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS.....	13
2.1. Micelização	13
2.2. Síntese de copolímeros anfipáticos	15
2.3. Carregamento de fármacos.....	16
2.4. Caracterização	16
2.5. Vantagens e desvantagens.....	18
3. APLICAÇÕES DAS MICELAS POLIMÉRICAS	21
3.1. <i>Multi-Drug Therapy</i>	21
3.2. Micelas sensíveis a estímulos.....	26
3.2.1. Micelas sensíveis ao pH	27
3.2.2. Micelas sensíveis à temperatura	32
3.3. <i>Theranostics</i>	39
4. CONCLUSÃO	49
5. BIBLIOGRAFIA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Micela polimérica	11
Figura 2: Micela iónica	11
Figura 3: Micela reversa.....	11
Figura 4: Propriedades/interações relevantes no processo de micelização e na veiculação de fármacos.....	15
Figura 5: Vantagens da multi-drug delivery (MDD)	22
Figura 6: Vantagens da utilização de micelas poliméricas na MDD	24
Figura 7: Taxa de libertação de PTX e 17-AAG em soro fetal bovino.....	25
Figura 8: Percentagem de células SKOV-3 do cancro do ovário humano viáveis após tratamento com PTX e 17-AAG, a diferentes concentrações, após 72 h	25
Figura 9: Perfil de libertação cumulativa de DOX e PDTC a diferentes valores de pH.	31
Figura 10: Percentagem de células viáveis após exposição (48 h a 37°C) à DOX pura, associada com PDTC, na forma livre e carregada em micelas de FA-CS, a diferentes concentrações.....	32
Figura 11: Percentagem de células 4T1 viáveis após exposição de 48 horas à DOX livre e carregada em micelas de P(NIPAAm-co-DMAAm)-b-PLGA, a diferentes concentrações, a 37°C e 39,5°C	36
Figura 12: Perfil de libertação cumulativa do docetaxel carregado em micelas de P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA a 37°C e 43°C.....	37
Figura 13: Percentagem de células BGC823, HepG2 e LoVo viáveis após exposição ao docetaxel livre e veiculado em micelas de P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA, a 37°C e 43°C	39
Figura 14: Modo de acção dos theranostics	41
Figura 15: Estrutura do sistema theranostic: micelas TGPM.....	42
Figura 16: Percentagem de micelas com e sem anticorpos anti-AFP, no interior das células HepG2, às 0,5 h e 2 h	43

Figura 17: Ressonância magnética in vitro de Magnevist®, água e micelas com e sem anticorpos anti-AFP	44
Figura 18: Intensidade e duração do sinal emitido in vivo pelo Magnevist® e micelas com e sem anticorpos anti-AFP	44
Figura 19: Percentagem de células HepG2 viáveis após exposição a micelas TGPM sem PTX e a concentrações de 0,01 µg, 0,1 µg e 1 µg de PTX livre (Taxol®) e veiculado em micelas com e sem anticorpos anti-AFP, com um tempo de exposição de 24 h e 48 h..	46
Figura 20: Índice de inibição tumoral in vivo pela solução salina (NS), pelo PTX na forma livre (Taxol®) e pelo PTX veiculado em micelas com e sem anticorpos anti-AFP	47

LISTA DE ABREVIATURAS

17-AAG – 17-hidroximetil-17-demetoxigeldanamicina;

AFP – Alfafetoproteína;

CMC – Concentração Micelar Crítica

DOX – Doxorrubicina;

EPR – *Enhanced Permeability and Retention*;

Gd – Gadolínio;

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

HSP90 – *Heat Shock Protein 90*;

IC₅₀ – Concentração Inibitória Mínima;

I.V. – Intravenoso;

MDD – *Multi-Drug Delivery*;

MDT – *Multi-Drug Therapy*;

PDTC – Pirrolidina Ditiocarbamato;

PTX – Paclitaxel;

MPS – Sistema Fagocítico Mononuclear;

TCD_m – Temperatura Crítica de Dissolução Mínima;

TCD_M – Temperatura Crítica de Dissolução Máxima.

GLOSSÁRIO

Molécula anfipática: molécula que possui uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica;

Concentração micelar crítica (CMC): concentração mínima de emulgente a que se começam a formar micelas;

Contração: ião associado aos compostos iónicos no sentido de manter o equilíbrio elétrico;

Copolímero: polímero formado por diferentes monómeros (unidades que constituem os polímeros);

Eletrólito: substância que contém, na sua composição, iões livres sendo, por isso, um bom condutor de corrente elétrica;

Concentração inibitória mínima (IC₅₀): concentração mínima de fármaco necessária para inibir 50% de um processo biológico;

Temperatura crítica de dissolução mínima (TCDm): temperatura crítica abaixo da qual os componentes de uma mistura são miscíveis em todas as proporções;

Temperatura crítica de dissolução máxima (TCDM): temperatura crítica acima da qual os componentes de uma mistura são miscíveis em todas as proporções;

Ponto de turvação: temperatura abaixo da qual um fluido apresenta um aspeto turvo, devido à presença de partículas em suspensão;

Protonação: reação química da qual resulta uma ligação de um protão a um átomo, molécula ou ião;

Tensioativo: agente que diminui a tensão superficial de contacto entre dois líquidos.

1. INTRODUÇÃO

A nível mundial, uma em cada sete mortes ocorre devido ao cancro, sendo esta doença responsável por um maior número de mortes do que a SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Humana), a tuberculose e a malária juntas, o que a torna a segunda principal causa de morte, atrás das doenças cardiovasculares. Os dados mundiais mais recentes remetem a 2012, fornecidos pela American Cancer Society (2015), e mostram que nesse ano se verificaram 7 427 100 novos casos de cancro em homens e 6 663 000 em mulheres, o que perfaz um total de, aproximadamente, 14,1 milhões de novos casos de doença oncológica. Os mesmos dados revelaram ainda que, no mesmo ano, 8,2 milhões de pessoas morreram devido ao cancro. As previsões apontam para que em 2030, o número de novos casos de cancro cresça para os 21 milhões e que o número de mortes causadas por esta doença dispare para os 13 milhões, duplicando, assim, as estatísticas actuais (American Cancer Society, 2015).

Atualmente, a medicina e as ciências farmacêuticas continuam a enfrentar um obstáculo comum no combate a algumas patologias de gravidade elevada, em particular do cancro: a eficácia das terapêuticas. Como refere a American Cancer Society (2016), apesar de já existirem várias alternativas, que se complementam, para o tratamento do cancro, como a radioterapia ou a terapia hormonal, a quimioterapia continua a ter um papel fundamental na terapêutica da doença oncológica. Alguns dos principais problemas associados aos medicamentos antineoplásicos são a falta de seletividade para os tecidos alvo, a degradação precoce dos agentes quimioterapêuticos, a sua baixa solubilidade em meios aquosos, os efeitos adversos, devido à elevada toxicidade destes agentes, e a baixa biodisponibilidade nos locais de ação (Gaucher et al., 2005; Torchilin, 2007).

Com vista a ultrapassar estes problemas, desenvolveram-se estudos, na área da nanotecnologia, acerca de sistemas nanométricos de veiculação de fármacos (1-100 nm). Alguns exemplos de nanotransportadores já estudados são lipossomas, micelas poliméricas, conjugados polímero-fármaco, fármacos nanocristalinos, dendrímeros, nanotubos de carbono, entre outros (Bamrungsap et al., 2012).

Os nanotransportadores vêm oferecer soluções aos atuais problemas associados à terapêutica oncológica, diminuindo a toxicidade associada aos agentes quimioterapêuticos, aumentando a sua solubilidade, estabilidade e concentração nos locais alvo, reduzindo, assim, as desvantagens da sua utilização. As características que

estes sistemas de veiculação possuem conferem-lhes a capacidade de incorporar fármacos hidrofóbicos no seu interior, aumentando a sua solubilidade em meios aquosos e também a sua biodisponibilidade nos locais de ação, proporcionam maior estabilidade aos agentes terapêuticos e à sua veiculação, ativa ou passiva, aos locais onde têm que desenvolver a ação terapêutica. Para além disto as propriedades inerentes aos nanotransportadores vão ainda diminuir a toxicidade associada aos fármacos e impedir a sua agregação e deposição (possíveis quando administrados na forma livre), reduzindo o risco de embolismo (Aqil, Munagala, Jeyabalan, & Vadhanam, 2013; Gaucher et al., 2005; Li & Huang, 2008; Torchilin, 2007). Outra das grandes vantagens dos nanotransportadores no tratamento do cancro é a capacidade de incorporação simultânea de múltiplos fármacos no veículo, permitindo que haja um sinergismo de efeitos terapêuticos proporcionado pelos diferentes fármacos incorporados (Shin, Alani, Rao, Rockich, & Kwon, 2009; Thipparaboina, Chavan, Kumar, Modugula, & Shastri, 2015).

As vantagens associadas à terapêutica oncológica, por meio de agentes quimioterapêuticos, conseguida pelos sistemas nanométricos de veiculação de fármacos, permite que haja uma redução das doses administradas e do número de tomas diárias, o que funciona como incentivo a uma boa adesão à terapêutica, e a longo termo levará a uma redução dos custos do tratamento (Bamrungsap et al., 2012; Dikmen, Genç, & Güney, 2011).

Os diferentes tipos de nanotransportadores, referidos anteriormente, apresentam características particulares e vantagens e desvantagens entre eles. Devido à capacidade que têm em armazenar e transportar elevadas doses de fármaco, à boa tolerabilidade pelo organismo e à versatilidade que apresentam, as micelas poliméricas tornam-se num dos nanotransportadores de maior interesse (Dikmen et al., 2011; Yokoyama, 2011).

As micelas são nanopartículas constituídas por um núcleo interno hidrofóbico estabilizado por uma face externa hidrofílica (Fig. 1), cuja formação é resultante da agregação de blocos poliméricos anfipáticos quando, num sistema, são atingidas concentrações de emulgente superiores à sua concentração micelar crítica (CMC). Quando em vez de blocos de copolímeros anfipáticos estivermos perante espécies poliméricas com contraíões associados, isto é, com uma extremidade carregada positivamente e a outra carregada negativamente, vamos obter micelas iónicas, representadas na figura 2. Em meios não-polares formam-se micelas reversas, em que a porção hidrofílica forma o núcleo da micela enquanto as caudas hidrofóbicas constituem

a face externa da mesma, como mostra a figura 3 (Attwood & Florence, 2012; Mukerjee, 1978; Oerlemans et al., 2010).

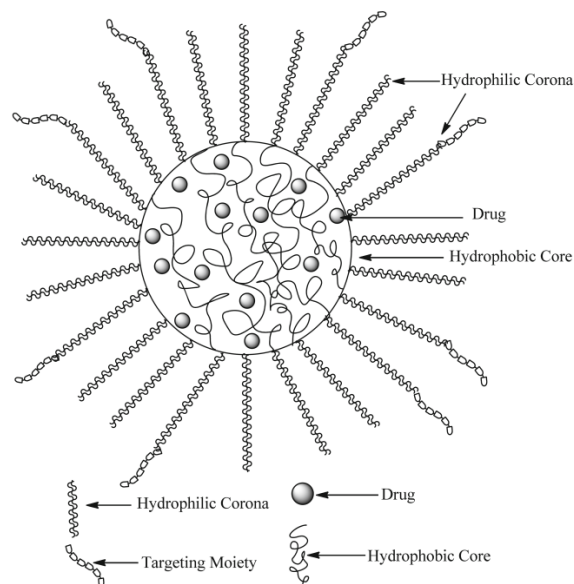


Figura 1: Micela polimérica (Gothwal, Khan, & Gupta, 2016)

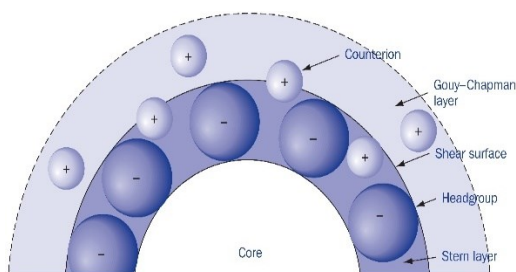


Figura 2: Micela iônica (Attwood & Florence, 2012)

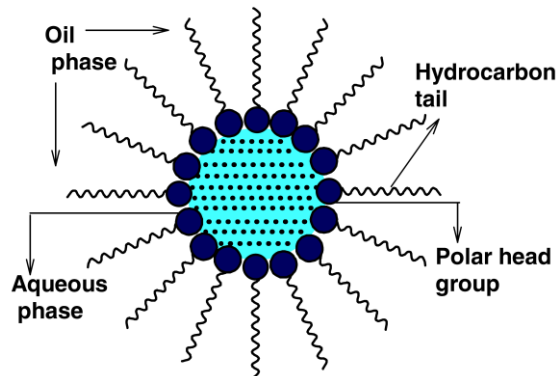


Figura 3: Micela reversa (Malik, Wani, & Hashim, 2012)

A concentração de emulgente à qual se começam a formar micelas denomina-se concentração micelar crítica (CMC). Esta concentração varia de emulgente para emulgente e está dependente de vários fatores e características como: estrutura do grupo hidrofóbico – quanto maior for a cadeia hidrocarbonada, mais baixa vai ser a CMC; natureza do grupo hidrofílico – compostos iônicos têm, geralmente, CMC mais

elevadas; natureza dos contraíões – a presença de contraíões orgânicos no agente tensioativo diminui a CMC; presença de eletrólitos – quanto maior for a quantidade de eletrólitos presentes na solução, menor vai ser a CMC; a temperatura – se em agentes tensioativos iônicos a temperatura não manifesta grande influência na CMC, no caso dos não-iônicos o aumento da temperatura a níveis superiores ao ponto de turvação vai diminuir a CMC (Attwood & Florence, 2012; Mukerjee, 1978; Oerlemans et al., 2010).

As micelas conferem, não só uma maior solubilidade aos fármacos que transportam, mas também uma série de outras vantagens que permitem aos mesmos uma maior eficácia junto dos locais alvo, e que serão analisadas mais à frente nesta monografia. As vantagens inerentes às micelas são conseguidas graças à sua estrutura, que lhes confere propriedades únicas no que à veiculação de fármacos diz respeito. Esta estrutura permite às micelas incorporar compostos pouco solúveis em meios aquosos, minimizando as interações entre os mesmos e o ambiente aquoso envolvente, o que é essencial no caso dos medicamentos administrados por via oral, permitindo que os mesmos sejam bem absorvidos, e no caso dos medicamentos hidrofóbicos, possibilitando a sua administração por via intravenosa (I.V.), sem recurso a solubilizantes. Para além disto, quando se incorporam fármacos em micelas, o complexo formado entre ambos possui uma massa molecular maior do que a exibida pelas moléculas de fármaco livres, tornando-o, assim, mais resistentes à eliminação hepática e renal precoce, persistindo mais tempo na circulação sanguínea e chegando em maiores quantidades aos locais alvo (Oerlemans et al., 2010; Thipparaboina et al., 2015).

A versatilidade manifestada pelas micelas oferece-lhes uma vasta de gama de utilizações capazes de minimizar os problemas associados à veiculação de fármacos e de otimizar a mesma. Micelas sensíveis a estímulos e micelas com propriedades terapêuticas e de diagnóstico são apenas alguns dos exemplos das aplicações possíveis destes sistemas, as quais serão abordadas mais adiante nesta revisão (Thipparaboina et al., 2015).

2. MICELAS POLIMÉRICAS: SISTEMAS DE VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS

Como foi visto anteriormente, as micelas possuem características únicas no que à veiculação de fármacos diz respeito. Graças à sua estrutura singular, estes sistemas de veiculação de fármacos apresentam capacidade de retenção de grandes quantidades de fármaco no seu interior, uma excelente distribuição no organismo, aptidão para uma vetorização dos fármacos e capacidade de minimizar as interações entre os fármacos transportados e o meio envolvente, aumentando assim a sua estabilidade (Kataoka, Harada, & Yu., 2001).

O sucesso da veiculação de fármacos com recurso a micelas está dependente do tamanho e das propriedades da estrutura das mesmas, pelo que se torna essencial uma conceção correta destes dois parâmetros. No que diz respeito à dimensão das micelas, estas apresentam-se num intervalo de tamanhos muito estreito (1-100 nm) e semelhante ao de outros sistemas de veiculação, como vírus e lipoproteínas. A dimensão exibida pelas micelas é uma importante vantagem no que diz respeito à sua distribuição no organismo e vai ter uma acentuada influência no efeito EPR (*enhanced permeability and retention*), efeito que se caracteriza por um aumento da acumulação de partículas ao nível dos tecidos tumorais devido ao rápido e contínuo crescimento celular que se verifica nesta zona e que estimula a formação de novos vasos sanguíneos de forma a garantir o aporte sanguíneo necessário ao crescimento celular. Relativamente à sua estrutura, as micelas devem apresentar características que as capacitem de reter o maior número possível de fármacos e de os fazer interagir com os tecidos alvo nas condições mais adequadas (Kataoka et al., 2001).

2.1. Micelização

Para compreendermos melhor a função das micelas enquanto sistemas de veiculação de fármacos, é essencial olharmos para o seu processo de formação. A micelização é um processo espontâneo que ocorre devido à tendência que as porções hidrofóbicas das moléculas anfipáticas têm em se separar da fase aquosa, quando inseridas num meio aquoso, agregando-se umas às outras, visando reduzir a área de contacto com o meio aquoso, e formando as estruturas a que chamamos micelas. Este processo de agregação está dependente de uma combinação de forças intermoleculares,

como: interações hidrofóbicas e interações electroestáticas; em casos particulares, como a presença de metais ou moléculas com hidrogénios associados também as forças exercidas pela complexação de metais e pelas pontes de hidrogénio estão envolvidas no processo de micelização. A estrutura e dimensão das micelas poliméricas formadas está diretamente dependente da estrutura dos polímeros que lhes dão origem. A figura 4 resume as propriedades e interações relevantes no processo de micelização (Kataoka et al., 2001; Mukerjee, 1978).

Atendendo às funções que tanto a porção hidrofóbica como a hidrofílica dos polímeros desempenham no processo de micelização e de veiculação de fármacos, é importante olhar para algumas propriedades a que estas devem atender. Relativamente ao bloco hidrofílico é importante que este possua certas propriedades, como: uma boa solubilidade em meios aquosos, permitindo a solubilização dos fármacos incorporados na micela; uma flexibilidade razoável, permitindo o movimento das cadeias hidrofóbicas para que possam estabelecer interações, estabilizando, assim, as micelas; características físico-químicas e biológicas adequadas ao meio onde estão inseridas e ao local de ação onde os fármacos transportados têm que atuar. No que ao bloco hidrofóbico diz respeito, deve-se ter em atenção a combinação de forças anteriormente faladas, não só pela sua importância no processo de micelização, mas também pela influência que este vai desempenhar na incorporação do fármaco, dada a ligação que vai estabelecer com o mesmo. A estabilidade da micela é essencialmente garantida pelas interações estabelecidas pelo bloco hidrofóbico. Assim, quanto maior for o comprimento do bloco hidrofóbico, menor será a CMC e consequentemente, mais estável será a micela formada porque a sua taxa de dissociação vai ser mais baixa, o que promove uma melhor retenção de fármaco e, consequentemente, uma maior concentração nos locais alvo (Kataoka et al., 2001; Kedar, Phutane, Shidhaye, & Kadam, 2010).

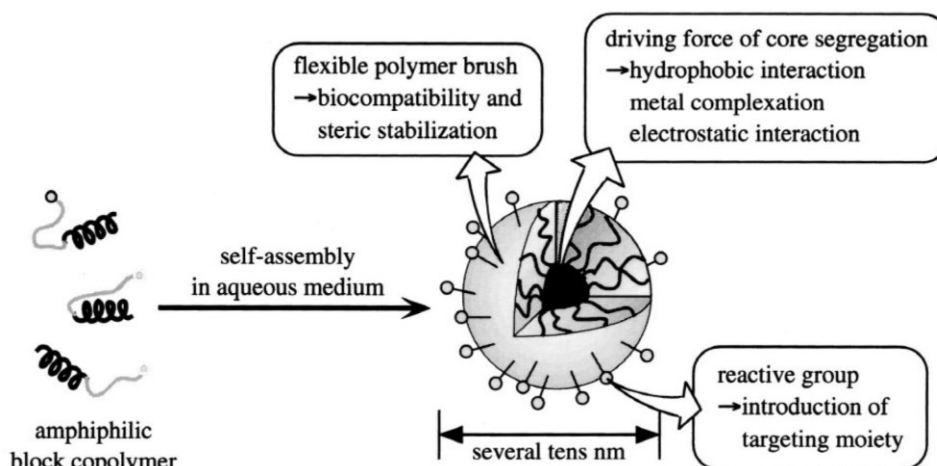


Figura 4: Propriedades/interações relevantes no processo de micelização e na veiculação de fármacos (Kataoka et al., 2001)

2.2. Síntese de copolímeros anfipáticos

Apesar da micelização ser o passo chave na obtenção de micelas para a veiculação de fármacos, o processo de obtenção das mesmas começa um pouco antes com a síntese dos copolímeros anfipáticos desejados.

A síntese de copolímeros anfipáticos é conseguida através da junção de blocos poliméricos hidrofílicos com blocos poliméricos hidrofóbicos. Esta junção pode ser feita de inúmeras maneiras e com inúmeros polímeros. Diferentes combinações entre as porções hidrofílica e hidrofóbica originam diferentes micelas, com propriedades distintas e específicas. Assim, através da escolha dos polímeros certos, podemos obter micelas com as propriedades mais adequadas ao tipo de veiculação desejado. Para além deste método, também é possível obter micelas com propriedades particulares, como por exemplo a vetorização de fármacos ou micelas sensíveis a estímulos, enxertando grupos funcionais específicos ao bloco hidrofílico dos copolímeros ou utilizando polímeros sensíveis a estímulos na síntese dos blocos poliméricos (Gaucher et al., 2005; Kedar et al., 2010).

2.3. Carregamento de fármacos

Após a síntese de copolímeros anfipáticos, o processo de micelização e o aprisionamento de fármacos nas micelas ocorrem em simultâneo. A incorporação de fármacos em micelas pode ocorrer por conjugação química ou por aprisionamento físico. Existem várias técnicas de carregamento de fármacos, sendo que os métodos tipicamente usados são o método de diálise, o método de evaporação do solvente de uma emulsão óleo em água e o método de dispersão sólida (Kedar et al., 2010).

Quando estamos perante uma mistura de copolímeros com fármaco num solvente orgânico miscível com a água e a sujeitamos a uma diálise contra água, a evaporação, lenta, da fase orgânica vai induzir a formação de micelas com o fármaco no seu interior, correspondendo este ao método de carregamento através de diálise (Gaucher et al., 2005).

Se adicionarmos à água (previamente destilada) o fármaco juntamente com os polímeros (previamente dissolvidos num solvente orgânico imiscível em meio aquoso), sob uma forte agitação, vai-se originar uma emulsão óleo em água que após rearranjo polimérico, causado pela evaporação do solvente, vai originar micelas carregadas com fármaco. Este é o método de carregamento mediante emulsão óleo em água (Kedar et al., 2010).

O método de dispersão sólida, consiste na obtenção de micelas carregadas com fármaco, partindo de uma solução de fármaco e polímeros num solvente orgânico, da qual se faz evaporar o solvente. Após a evaporação do composto orgânico, forma-se uma matriz sólida de polímeros, onde as interações fármaco polímero estão favorecidas. Esta, após ser submetida à reidratação com um solvente aquoso, previamente aquecido, vai originar micelas já carregadas com fármaco (Gaucher et al., 2005; Kedar et al., 2010).

2.4. Caracterização

Quando se fala em caracterização de micelas poliméricas, fala-se de um processo que consiste na determinação das propriedades das mesmas, com vista a conhecer melhor o sistema de veiculação desenvolvido. Os aspetos com maior relevância são a CMC, o tamanho da micela e dos seus polímeros, a sua estrutura e

respetivas propriedades, a densidade das mesmas e o seu comportamento enquanto veículo (Kedar et al., 2010).

A avaliação da CMC é essencial para o conhecimento das micelas originadas, pois como foi visto anteriormente, a CMC é um dos parâmetros que melhor define a estabilidade destes sistemas. A monitorização deste parâmetro pode ser feita através de um método de solubilização de agentes corantes, agentes estes que se vão acoplar aos polímeros e que, quando ocorre o processo de micelização, vão provocar uma alteração na absorvância, correspondendo a concentração a que ocorre esta alteração à CMC (Kedar et al., 2010; Sezgin, Yüksel, & Baykara, 2006).

O tamanho das micelas formadas pode ser avaliado através de uma técnica de difração de luz em que se faz passar as micelas por um feixe de raios laser, sendo que as alterações provocadas neste feixe oferecem-nos dados acerca do tamanho e estrutura das micelas. Outros métodos como cromatografia, eletroforese ou ressonância magnética nuclear são alternativas para a obtenção de informação relativa ao tamanho, estrutura e massa molecular dos polímeros e micelas (Kedar et al., 2010; Sezgin et al., 2006).

A análise microscópica é outro dos métodos que nos permite avaliar o tamanho, a morfologia e a estrutura das micelas poliméricas, podendo recorrer-se a várias técnicas microscópicas, de entre as quais, a microscopia de força atómica, a microscopia eletrónica de varrimento, a microscopia eletrónica de transmissão ou a microscopia confocal, sendo que esta última oferece imagens com melhor qualidade e em três dimensões (Kedar et al., 2010).

As propriedades e alterações verificadas na superfície das micelas poliméricas são analisadas através da avaliação do potencial zeta, enquanto a estrutura nuclear e as interações que nela ocorrem são avaliadas por meio de uma técnica de calorimetria diferencial de varrimento. O teste à atividade do complemento (CH50) é outro método capaz de avaliar as características da superfície das micelas, analisando a quantidade de proteínas do complemento que estas adsorvem (Kedar et al., 2010; Sezgin et al., 2006).

Outro parâmetro que é importante monitorizar é o grau de polimerização, de dispersão polimérica e de ramificação dos polímeros. Esta monitorização pode ser feita através da determinação da temperatura crítica de dissolução mínima (TCDm), que nos vai permitir avaliar a influência da temperatura nos polímeros (Kedar et al., 2010).

Relativamente ao comportamento das micelas enquanto sistemas de veiculação podem ser realizados vários testes de modo a avaliar diferentes parâmetros. Os testes *in vitro* procuram refletir o desempenho das micelas no organismo humano, por isso, testes

relativos à libertação de fármaco e à citotoxicidade podem ser realizados *in vitro*, sendo que o primeiro parâmetro é avaliado através da medição das concentrações de fármaco libertado ao longo do tempo, perante condições definidas e controladas, enquanto o parâmetro da toxicidade celular é medido com base no efeito que os compostos químicos desencadeiam nas funções básicas das células. Para avaliar a interação estabelecida entre as micelas poliméricas e os recetores de fármacos, pode recorrer-se a uma citometria de fluxo (Kedar et al., 2010).

Todas as técnicas revistas anteriormente estão clara e sucintamente explicadas por Kedar et al. (2010) em “*Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting*”.

2.5. Vantagens e desvantagens

Após a análise feita à estrutura das micelas poliméricas, enquanto sistema de veiculação de fármacos, e aos processos de micelização e carregamento, é de relativa importância olhar para as vantagens e desvantagens associadas às micelas e à veiculação por si proporcionada, uma vez que estes dados permitem uma análise diferenciadora entre diferentes sistemas nanométricos de veiculação de fármacos.

Como principais vantagens da veiculação por meio de micelas temos:

Tamanho – as micelas poliméricas apresentam uma dimensão que varia entre os 10 nm e os 100 nm de diâmetro. Este tamanho muito pequeno das micelas é essencial para garantir a estabilidade e a longevidade adequadas das mesmas na circulação sanguínea. Por apresentarem uma dimensão inferior à que conduz a eliminação renal, hepática e pelo sistema fagocítico mononuclear (MPS), têm assegurada a longevidade da sua circulação sanguínea (Dikmen et al., 2011; Oerlemans et al., 2010; Yokoyama, 2011).

Outra das vantagens associada à dimensão das micelas é o facto da mesma permitir uma esterilização fácil e barata das mesmas, aquando do processo de produção (Yokoyama, 2011).

Ainda relativamente às suas dimensões, o diâmetro das micelas permite-lhes um extravasamento nas zonas cancerígenas, devido ao efeito EPR que se verifica ao nível na vasculatura tumoral (Oerlemans et al., 2010).

Estabilidade estrutural – as micelas, graças às interações estabelecidas pelos polímeros hidrofóbicos que constituem o seu núcleo, manifestam uma elevada estabilidade estrutural. Esta estabilidade manifesta-se de duas maneiras: estabilidade estática – a CMC das micelas poliméricas é bastante baixa, o que faz com que mesmo em concentrações baixas, os polímeros se mantenham agregados em micelas; estabilidade dinâmica – as micelas apresentam taxas de dissociação muito baixas, o que é muito importante para o sucesso da veiculação de fármacos *in vivo* (Yokoyama, 2011).

Solubilização de fármacos hidrofóbicos – a possibilidade de incorporar fármacos hidrofóbicos é uma das principais vantagens das micelas enquanto sistemas de veiculação. O aprisionamento deste tipo de fármacos permite-lhes serem corretamente absorvidos, caso sejam administrados por via oral, e serem administrados via I.V. sem a necessidade de adjuvantes solubilizantes (Oerlemans et al., 2010; Yokoyama, 2011).

Esta é uma propriedade bastante vantajosa, uma vez que muitos dos principais fármacos que estão a ser desenvolvidos para patologias mais graves, como é o caso do cancro, são hidrofóbicos (Yokoyama, 2011).

Capacidade de incorporação elevada – as micelas são dos sistemas de veiculação de fármacos capazes de transportar maiores quantidades de fármaco no seu interior. Isto é uma vantagem, não só por permitir um maior aproveitamento do fármaco que é administrado, vetorizando-o ao seu local alvo e assim necessitando de doses mais baixas do mesmo, mas também por permitir a veiculação de múltiplos fármacos em simultâneo, o que, traz importantes vantagens à terapêutica, como, por exemplo, o sinergismo de efeitos de diferentes fármacos (Thipparaboina et al., 2015; Yokoyama, 2011).

Capacidade de incorporação diversificada – tão importante como a quantidade de fármaco que as micelas poliméricas são capazes de carregar no seu interior, é a variedade de agentes terapêuticos que estas conseguem incorporar. Graças à capacidade que estes sistemas têm de carregar fármacos, quer por conjugação química, quer por aprisionamento físico, o leque de agentes terapêuticos que podem ser incorporados é bastante vasto, variando entre fármacos, genes ou até mesmo agentes de contraste. Este vasto leque de agentes que podem ser incorporados confere às micelas outras funções para além da veiculação de fármacos (Thipparaboina et al., 2015; Yokoyama, 2011).

Baixa toxicidade – a baixa toxicidade das micelas é uma vantagem que torna a veiculação de fármacos *in vivo* mais segura e tolerável. Os tensioativos poliméricos que dão origem às micelas são conhecidos como sendo moléculas com baixa toxicidade associada, fator bastante importante na minimização de possíveis reações adversas (Thipparaboina et al., 2015; Yokoyama, 2011).

Relativamente às desvantagens deste sistema de veiculação polimérico, estão evidenciadas as seguintes:

Dificuldade da síntese de polímeros – a síntese de polímeros anfipáticos com as propriedades químicas e estruturais desejadas requer estudos complexos e é pouco reprodutível à escala industrial (Yokoyama, 2011).

Tecnologia de carga pouco desenvolvida – vários são os métodos disponíveis para se proceder à incorporação de fármacos no interior de micelas poliméricas. No entanto, não existe nenhum método padrão definido e que seja aplicável a todas as espécies de polímeros (Kedar et al., 2010; Yokoyama, 2011).

Extravasamento lento – ainda que o extravasamento das micelas da circulação sanguínea seja uma das principais vantagens deste sistema de veiculação, o facto deste processo ocorrer de forma lenta torna-se uma desvantagem. A lentidão do extravasamento das micelas carregadas com o fármaco leva a que tenha que haver um aumento da distribuição de fármaco ao local de ação, funcionando este último processo como um fenómeno compensatório, de forma a garantir o efeito terapêutico esperado (Yokoyama, 2011).

Risco de toxicidade crónica – os fármacos incorporados em micelas sofrem uma eliminação hepática mais lenta do que os fármacos livres, uma vez que existe uma maior dificuldade das enzimas metabólicas em aceder ao composto terapêutico, o que pode levar a uma acumulação de fármaco no organismo (Yokoyama, 2011).

3. APLICAÇÕES DAS MICELAS POLIMÉRICAS

Como acabámos de ver, as micelas poliméricas apresentam propriedades e vantagens que as tornam num dos sistemas de veiculação de fármacos com maior interesse. Para além das características anteriormente analisadas, a versatilidade manifestada por esta espécie de nanotransportadores funciona com um estímulo ao estudo destes sistemas enquanto veículos de fármacos. Esta versatilidade confere às micelas poliméricas uma ampla gama de funcionalidades que podem constituir soluções para determinados problemas associados à veiculação de agentes terapêuticos já existentes ou, até, permitir a utilização de novos fármacos.

De entre a vasta gama de aplicações que as micelas poliméricas apresentam, esta revisão incide essencialmente sobre: terapêutica com múltiplos fármacos – *multi-drug therapy* (MDT); micelas sensíveis ao pH; micelas sensíveis à temperatura; e *theranostics*.

3.1. *Multi-Drug Therapy*

Muitas patologias graves e de abordagem sensível manifestam dificuldades terapêuticas relativamente ao efeito dos fármacos utilizados e à toxicidade causada pelos mesmos. Um bom exemplo disso, conforme discutido anteriormente, é o cancro. Os avanços na tecnologia e na medicina revelaram uma elevada complexidade e heterogeneidade das células cancerígenas, que resulta na ineficácia do tratamento quando se utilizam agentes terapêuticos isoladamente. Estas descobertas incentivaram ao estudo de alternativas para o tratamento do cancro (Gadde, 2015; Shin et al., 2009).

A administração, simultânea ou sequencial, de dois ou mais fármacos diferentes, com finalidades e mecanismos de ação semelhantes ou distintos, é denominada de *multi-drug therapy*, e apresenta-se como uma possível solução à falta de eficácia dos tratamentos até agora explorados. Algumas das principais vantagens associadas a este método terapêutico estão sucintamente descritas na figura 5 (Thipparaboina et al., 2015).

A multirresistência a fármacos é um dos principais problemas relacionados com a terapêutica do cancro, e consiste numa resistência inerente ou adquirida a vários agentes terapêuticos, desencadeada por diversos mecanismos, de entre os quais a diminuição da absorção de fármaco ou o aumento do seu efluxo. A superação deste

problema é uma das principais vantagens da *multi-drug therapy*, uma vez que é possível a administração combinada de medicamentos quimioterapêuticos com agentes que combatem os mecanismos de resistência, como RNA de interferência (siRNA) específicos para estes mecanismos, inibidores da bomba de efluxo ou proteínas pro-apoptóticas (Gadde, 2015; Gillet & Gottesman, 2010; Thipparaboina et al., 2015).

Outra das grandes vantagens deste método terapêutico é a possibilidade de obtenção de um sinergismo de efeitos dos diferentes fármacos combinados. Quando administrados em combinação, os diferentes mecanismos de ação de cada fármaco complementam-se e obtém-se um efeito terapêutico final superior àquele que se obteria utilizando os fármacos isoladamente. Assim, podemos concluir que a *multi-drug therapy* desencadeia uma resposta mais eficaz, necessitando recorrer a doses mais baixas de fármacos para obter efeitos semelhantes ou superiores aos verificados na utilização isolada dos agentes terapêuticos e consequentemente reduzindo a toxicidade associada ao tratamento (Gadde, 2015; Shin et al., 2009; Thipparaboina et al., 2015).

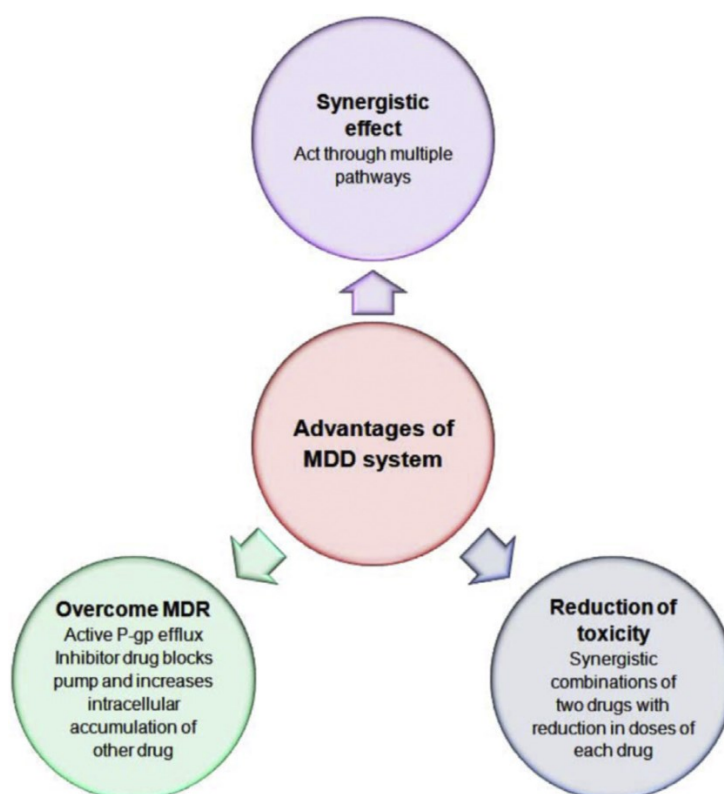


Figura 5: Vantagens da *multi-drug delivery* (MDD) (Thipparaboina et al., 2015)

Estudos *in vitro* comprovam as vantagens que a *multi-drug therapy* oferece ao tratamento de doenças, em particular do cancro, evidenciando eficácia terapêutica. No entanto, os estudos *in vivo* manifestaram problemas relacionados com a formulação e administração concomitante dos diferentes fármacos. Os principais obstáculos prendem-se com o facto dos diferentes fármacos, quando administrados em combinação apresentarem diferentes perfis farmacocinéticos e consequentes distribuições no organismo distintas, bem como elevados níveis de toxicidade, uma vez que a maior parte dos fármacos envolvidos no tratamento de patologias como o cancro são pouco solúveis em meios aquosos e requerem uma coadministração com excipientes solubilizantes tóxicos (Gadde, 2015; Shin et al., 2009).

Face às vantagens que a *multi-drug therapy* oferece e às limitações inerentes à sua implementação, tornou-se necessário estudar alternativas viáveis para se poder tirar o melhor partido deste tipo de tratamento. Procurou-se, então, descobrir sistemas de veiculação de fármacos com capacidade de solubilizar agentes quimioterapêuticos e de controlar a distribuição e libertação dos mesmos. Assim, surgem as micelas poliméricas, sistemas, que como já foi visto, são capazes de reter no seu interior grandes quantidades e uma extensa variedade de fármacos, e também de incorporar dois ou mais fármacos em simultâneo, permitindo uma distribuição simultânea ou sequencial dos agentes incorporados. Para além das propriedades anteriormente referidas, as micelas poliméricas são ainda sistemas muito seguros e pouco tóxicos, com elevada capacidade de solubilização de fármacos, como cita Shin et al. (2009). A distribuição de combinações de fármacos por meio de micelas permite, não só que haja uma uniformização dos perfis farmacocinéticos dos fármacos, através da capacidade que estes sistemas de veiculação possuem de controlar a libertação dos mesmos e de os vetorizar aos respetivos locais de ação, mas também um melhor índice de solubilização dos fármacos, o que por conseguinte vai diminuir os níveis de toxicidade (Gadde, 2015; Thipparaboina et al., 2015).

A figura 6 mostra uma série de vantagens proporcionadas pela utilização de micelas poliméricas na *multi-drug delivery* (MDD), onde podemos verificar que a utilização destes nanotransportadores proporciona, também, o aumento da concentração dos fármacos nos seus locais de ação e o sinergismo de efeitos dos diferentes agentes terapêuticos, que resultam num aumento da eficácia do tratamento (Gadde, 2015; Thipparaboina et al., 2015).

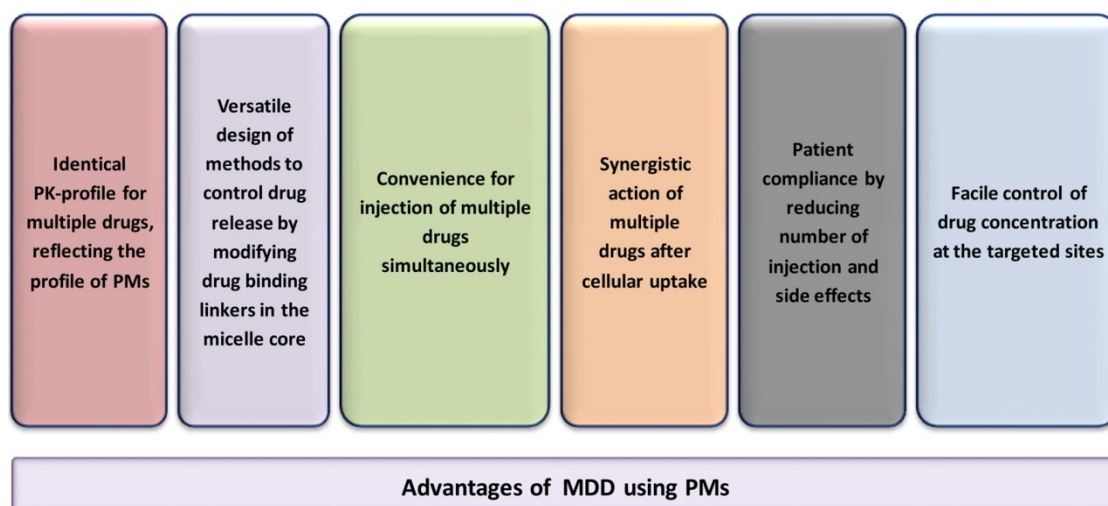


Figura 6: Vantagens da utilização de micelas poliméricas na MDD (Thipparaboina et al., 2015)

Um bom exemplo da eficácia das micelas poliméricas na MDD é o estudo desenvolvido por Katragadda, Teng, Rayaprolu, Chandran e Tan (2011) acerca da veiculação combinada de 17-hidroximetil-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) com paclitaxel (PTX), usando micelas poliméricas. A 17-AAG é um antibiótico com acção inibidora da HSP90 (*Heat Shock Protein 90*), uma proteína mediadora da sobrevivência das células tumorais, enquanto que o PTX é um agente citotóxico, sendo que ambos os fármacos são utilizados no tratamento do cancro nos ovários. A ação conjunta destes dois fármacos resulta num sinergismo de efeitos, em que a 17-AAG vai aumentar a sensibilidade das células tumorais à citotoxicidade do PTX, como comprovam os estudos de Sain et al. (2006) e Sawai et al. (2008), evidenciando que o tratamento com a combinação destes dois agentes é mais eficaz que a terapêutica isolada dos mesmos. Apesar do elevado potencial terapêutico que a combinação destes dois fármacos apresenta, a sua administração conjunta manifesta problemas farmacocinéticos e de toxicidade. Assim, Katragadda et al. (2011), procuraram avaliar a performance das micelas poliméricas enquanto veículos da combinação de 17-AAG com o PTX, sendo as micelas em estudo resultantes de uma mistura de copolímeros de polietilenoglicol-diesteril-fosfatidiletanolamina/tocoferol polietilenoglicol 1000 (PEG-DSPE/TPGS). Este estudo revelou que as micelas de PEG-DSPE/TPGS são uma solução fiável para a administração conjunta de 17-AAG e PTX, uma vez que a incorporação de ambos os fármacos nestes sistemas de veiculação não provocou alterações na eficácia dos mesmos, diminuiu a toxicidade e alargou o tempo de semivida plasmática dos agentes

terapêuticos, graças à liberação controlada proporcionada pelas micelas poliméricas, como demonstram as Figuras 7 e 8 (Katragadda et al., 2011; Sain et al., 2006; Sawai et al., 2008).

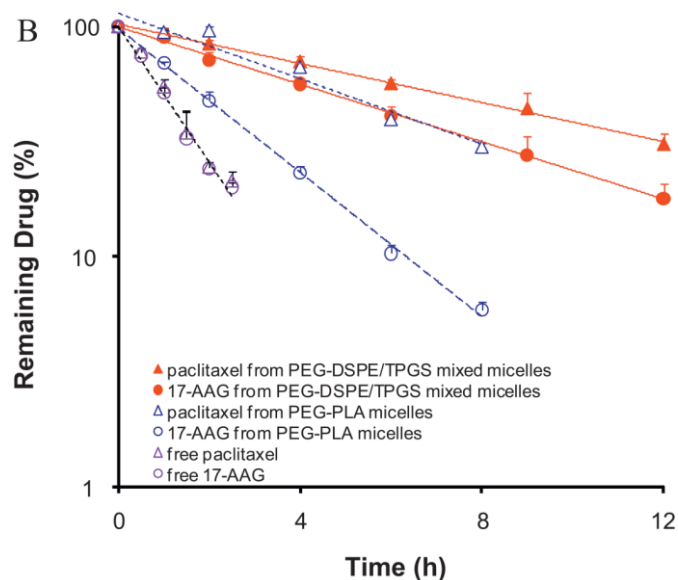


Figura 7: Taxa de liberação de PTX e 17-AAG em soro fetal bovino (Katragadda et al., 2011)

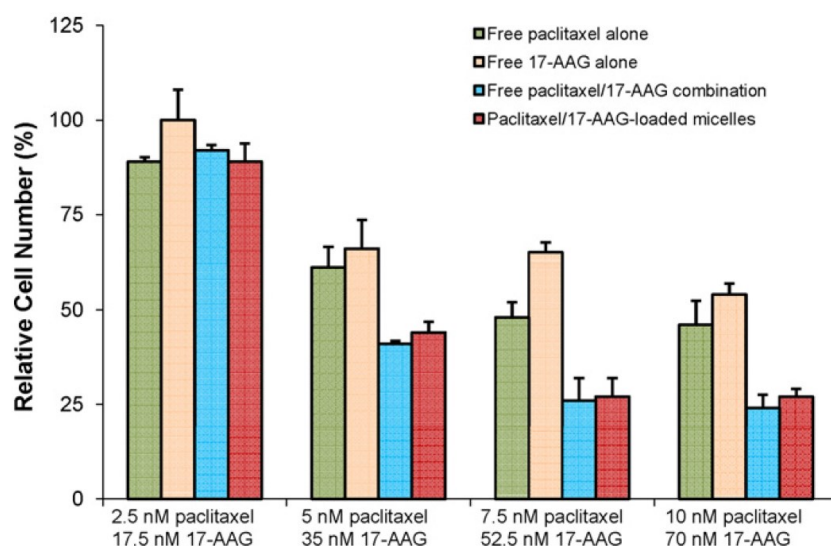


Figura 8: Percentagem de células SKOV-3 do cancro do ovário humano viáveis após tratamento com PTX e 17-AAG, a diferentes concentrações, após 72 h (Katragadda et al., 2011)

Outros exemplos de sucesso da terapêutica com múltiplos fármacos com recurso a micelas poliméricas são os estudos de Chitkara et al. (2012) e Emami et al. (2015), em que o primeiro aprecia o efeito sinérgico resultante da associação da ciclopamina com o gefitinib, no tratamento do cancro do pâncreas, e o segundo avalia o aumento da citotoxicidade do PTX quando combinado com o α -succinato de tocoferol (Chitkara et al., 2012; Emami et al., 2015).

3.2. Micelas sensíveis a estímulos

De entre todas as vantagens, anteriormente vistas, apresentadas pelas micelas na veiculação de fármacos, uma das que representa maior relevância para o sucesso terapêutico é a sua capacidade de vetorizar os agentes terapêuticos, de forma estável, aos seus locais ação e aumentar a concentração dos mesmos nos tecidos alvo. Esta vetorização é feita, principalmente, de um modo passivo, que como já foi analisado anteriormente, pode ser otimizada através modulação das características físicas e químicas das micelas poliméricas de modo a aumentar a sua acumulação nos locais desejados e torná-las suscetíveis ao efeito EPR verificado nos tecidos tumorais. Para além deste método, podem também ser utilizadas estratégias de vetorização ativa, como a integração de grupos funcionais com afinidade para os locais desejados e a inserção de polímeros sensíveis a estímulos nos blocos de copolímeros que formam as micelas.

Apesar do sucesso das micelas na vetorização de agentes terapêuticos, existem alguns problemas associados a estes sistemas, de entre os quais a dificuldade em conjugar a seletividade para os tecidos alvo com a libertação em quantidades adequadas, nestes mesmos locais, e ainda as baixas concentrações intracelulares que se verificam aquando da veiculação de fármacos por meio destes nanotransportadores. Como resposta a estas desvantagens e numa tentativa de otimizar a veiculação micelar de fármacos, desenvolveu-se um pouco mais o estudo desta espécie de nanotransportadores com vista a obter um sistema capaz de vetorizar os agentes terapêuticos até aos tecidos alvo, inclusivamente até ao meio intracelular, e de proceder a uma libertação completa e controlada dos mesmos, de forma a maximizar o efeito terapêutico dos fármacos e a minimizar os efeitos secundários relacionados com a toxicidade sistémica.

As micelas sensíveis as estímulos são resultado do desenvolvimento das micelas enquanto sistemas de veiculação de fármacos e apresentam propriedades capazes de colmatar as lacunas anteriormente relatadas. Estes nanotransportadores possuem

características que lhes permite veicular os fármacos incorporados de uma forma bastante estável até aos tecidos alvo e libertar os agentes terapêuticos de uma forma controlada e em quantidades apropriadas, mediante estímulos internos e/ou externos. Vários são os estímulos que podem induzir as micelas à libertação dos fármacos, de entre os quais destacamos o pH, a temperatura, a luminosidade, a atividade enzimática específica e os ultrassons, sendo os mais habitualmente utilizados o pH e a temperatura. De forma a garantir o sucesso destes sistemas de veiculação é essencial conhecer as propriedades físicas e químicas exibidas pelos tecidos alvo, em particular aquelas que os distinguem dos tecidos saudáveis, de maneira a desenvolver micelas sensíveis a estímulos somente exibidos nos locais de interesse, evitando a libertação de agentes terapêuticos em locais que não os desejados, garantindo a seletividade para o local de ação (Nakayama, Akimoto, & Okano, 2014; Yan & Li, 2016).

3.2.1. Micelas sensíveis ao pH

De todos os estímulos passíveis de ser utilizados para sensibilizar as micelas veiculadoras de fármacos e induzir a libertação dos mesmos, o pH é um dos que apresenta maior interesse de estudo e é dos mais utilizados, particularmente no tratamento do cancro. Os tecidos tumorais apresentam um pH ligeiramente mais ácido ($\text{pH} = 7,06$), quando comparados com o pH de tecidos saudáveis ($\text{pH} = 7,4$), devido ao efeito Warburg.

Este efeito baseia-se no facto das células cancerígenas terem necessidade de proceder a uma glicólise anaeróbica, devido ao escasso aporte sanguíneo de nutrientes e oxigénio, levando, na sequência deste processo, à produção de ácido láctico que vai induzir uma diminuição do pH ao nível destes tecidos. Estas diferenças verificadas entre a acidez dos tecidos normais e dos tecidos cancerígenos e a singularidade do valor de pH característico dos microambientes tumorais possibilita a utilização de micelas sensíveis ao pH no tratamento do cancro no sentido de otimizar a terapêutica (Heiden, Cantley, & Thompson, 2009; Yan & Li, 2016).

As micelas sensíveis ao pH têm um funcionamento dependente das variações e dos valores particulares do pH verificados nos diferentes tecidos do organismo. Estes sistemas compreendem, portanto, dois tipos de veiculação: a ativa, proporcionada pela sua sensibilidade ao pH; e a passiva, uma vez que a acumulação das micelas ao nível dos tecidos tumorais é uma característica inerente destes vetores, devido ao efeito EPR.

Este tipo de nanotransportadores garante um transporte estável dos fármacos carregados, na corrente sanguínea, até serem sujeitos a uma alteração nos níveis de acidez (característica do local alvo) que lhes vai causar alterações estruturais e, consequentemente, provocar a libertação dos agentes terapêuticos, sendo este o princípio base da atividade das micelas sensíveis ao pH. As propriedades inerentes a este tipo de micelas permitem que as mesmas libertem os fármacos apenas nos tecidos alvo, maximizando a eficácia dos agentes terapêuticos e reduzindo a toxicidade associada aos mesmos. Com base nesta metodologia, torna-se essencial o estudo prévio da acidez característica dos tecidos alvo, de modo a que seja possível proceder-se à formulação de micelas sensíveis a um valor de pH adequado ao tratamento requerido (Nakayama et al., 2014).

Relativamente às micelas utilizadas como agentes de veiculação de fármacos sensíveis ao pH e à sua estrutura, temos duas estratégias possíveis de formação das mesmas: a utilização de grupos ionizáveis sensíveis ao pH e o recurso a espécies possuidoras de ligações químicas suscetíveis ao pH, na formação dos blocos de copolímeros que originam as micelas (Nakayama et al., 2014; Yan & Li, 2016).

Se se utilizarem grupos protonáveis sensíveis ao pH nos blocos de copolímeros que constituem a estrutura das micelas, estas, quando submetidas ao grau de acidez estipulado vão sofrer a protonação dos referidos grupos, gerando uma repulsão polimérica, causada pelas cargas geradas, que leva à destabilização e desintegração das micelas e consequente libertação do fármaco (Nakayama et al., 2014).

Quando, nos blocos de copolímeros que originam as micelas são utilizados compostos cujas ligações químicas são cliváveis a determinado nível de acidez, os sistemas de veiculação formados, quando expostos a um pH predefinido e característico do local alvo, vão sofrer a clivagem das ligações químicas presentes na sua estrutura, desagregando-se e libertando o fármaco carregado para o exterior (Nakayama et al., 2014).

Alguns estudos comprovam a eficácia e as mais-valias que as micelas sensíveis ao pH oferecem ao tratamento do cancro, como é o caso do estudo desenvolvido por Gao, Lee, Kim e Bae (2005). Neste estudo, os autores testaram a eficácia de micelas poliméricas de poli(L-histidina)-*b*-PEG (poliHis/PEG) sensíveis ao pH na veiculação de doxorubicina (DOX), um conhecido agente quimioterapêutico, e o impacto que a vetorização feita por estes sistemas tem no tratamento do cancro do ovário. Em primeiro lugar, começaram por desenvolver testes *in vitro* onde analisaram os níveis de libertação

de fármaco, por parte das micelas de poliHis/PEG, em resposta à diminuição do pH e verificaram que a concentração de DOX era cerca de cinco vezes maior no meio mais ácido (pH = 6,8) do que no meio com índice de acidez similar ao verificado na circulação sanguínea (pH = 7,4), o que comprovou a sensibilidade das micelas formuladas ao pH e que a estabilidade das micelas durante o transporte sanguíneo está assegurada, garantindo menos dissipação de fármaco durante a veiculação e níveis mais elevados do mesmo ao nível dos tecidos tumorais. Os testes *in vivo* desenvolvidos posteriormente, ocorreram em ratos do sexo feminino aos quais se enxertaram células A2780 de cancro do ovário humano. Estes testes revelaram não só uma maior acumulação de DOX veiculada pelas micelas de poliHis/PEG nos tecidos cancerígenos mas também um crescimento mais lento do tumor, o que demonstra que as micelas sensíveis ao pH, em particular as de poliHis/PEG, têm uma influência bastante positiva no tratamento do cancro do ovário, aumentando a eficácia dos agentes quimioterapêuticos que veiculam (Gao et al., 2005).

Um outro estudo, um pouco mais recente, desenvolvido por Fan et al. (2010), veio demonstrar, uma vez mais, a importância da ação das micelas na potenciação do tratamento do cancro e ainda a capacidade que estes sistemas possuem em veicular os fármacos carregados até ao interior das células cancerígenas. Apesar da elevada acumulação de fármaco que se verifica ao nível dos tecidos tumorais aquando da veiculação micelar dos mesmos, níveis de libertação inadequados e/ou fracos índices de absorção dos agentes terapêuticos por parte das células cancerígenas podem levar ao insucesso da terapêutica (Thipparaboina et al., 2015). Assim, e com vista a ultrapassar este problema, pode recorrer-se às micelas e à sua capacidade de vetorizar fármacos para o meio intracelular.

O estudo realizado por Fan et al. (2010), é um dos mais completos no que diz respeito à veiculação micelar de fármacos e demonstrou a eficácia da veiculação de agentes quimioterapêuticos por meio de micelas no tratamento do cancro do fígado, baseado em três propriedades exibidas pelas mesmas, como a capacidade de transportar diferentes fármacos em simultâneo, a sensibilidade ao pH e a capacidade de vetorização intracelular de fármacos. Neste estudo os investigadores recorreram a micelas sensíveis ao pH formadas a partir de copolímeros de folato-quitosano (FA-CS), como meio de vetorização simultânea de doxorrubicina (DOX) com pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), sendo a DOX, como já foi visto, um agente quimioterapêutico, e o PDTC um inibidor do fator nuclear- κ B, um complexo proteico responsável pela indução e

desenvolvimento de várias doenças crônicas, de entre elas o cancro, funcionando neste caso como um agente sensibilizante das células tumorais à DOX (Gupta, Sundaram, Reuter, & Aggarwal, 2010). Ainda, relativamente às micelas utilizadas neste estudo e aos seus copolímeros, usou-se o folato (FA) na sua composição com vista a assegurar a entrada das micelas no espaço intracelular, uma vez que as proteínas de ligação ao folato estão sobreexpressas na superfície das células cancerígenas, funcionando como recetores. Uma vez no interior das células tumorais, e no sentido de libertar os fármacos ao nível dos lisossomas e endossomas, organelos conhecidos como dois dos maiores alvos dos agentes terapêuticos, as micelas vão libertar os fármacos em resposta à variação de pH manifestada a este nível. Assim, assegura-se que durante a circulação sanguínea e perante o pH fisiológico ($\text{pH} = 7,4$) as micelas permanecem integras e estáveis conservando os agentes terapêuticos no seu interior, mas quando expostas a um pH entre os 5 e os 6, como os verificados nos endossomas ($\text{pH} = 5-6$) e nos lisossomas ($\text{pH} = 6-7$), os fármacos se vão libertar dos veículos micelares e desempenhar a respetiva ação terapêutica (Fan et al., 2010).

Em resumo, este estudo procurou avaliar a libertação de fármaco *in vitro* a diferentes pH, a importância do folato na vetorização ativa das micelas para o espaço intracelular e a relevância do PDTC enquanto agente potenciador da ação da DOX, para assim concluir as vantagens e a utilidade destas estratégias no tratamento do cancro do fígado. Para avaliar a sensibilidade das micelas ao pH utilizou-se uma técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e aferiu-se o grau de libertação de fármaco, sempre nas mesmas condições de temperatura mas variando o valor do pH entre 5,0 e 8,0. Verificou-se que a libertação de DOX e PDTC foi ligeira e lenta a pH básicos e alcalinos, mas mediante um pH mais ácido atingiram-se taxas de libertação entre os 75% e os 95% e de uma forma muito mais rápida (Fig. 9), o que comprova a sensibilidade das micelas utilizadas (Fan et al., 2010).

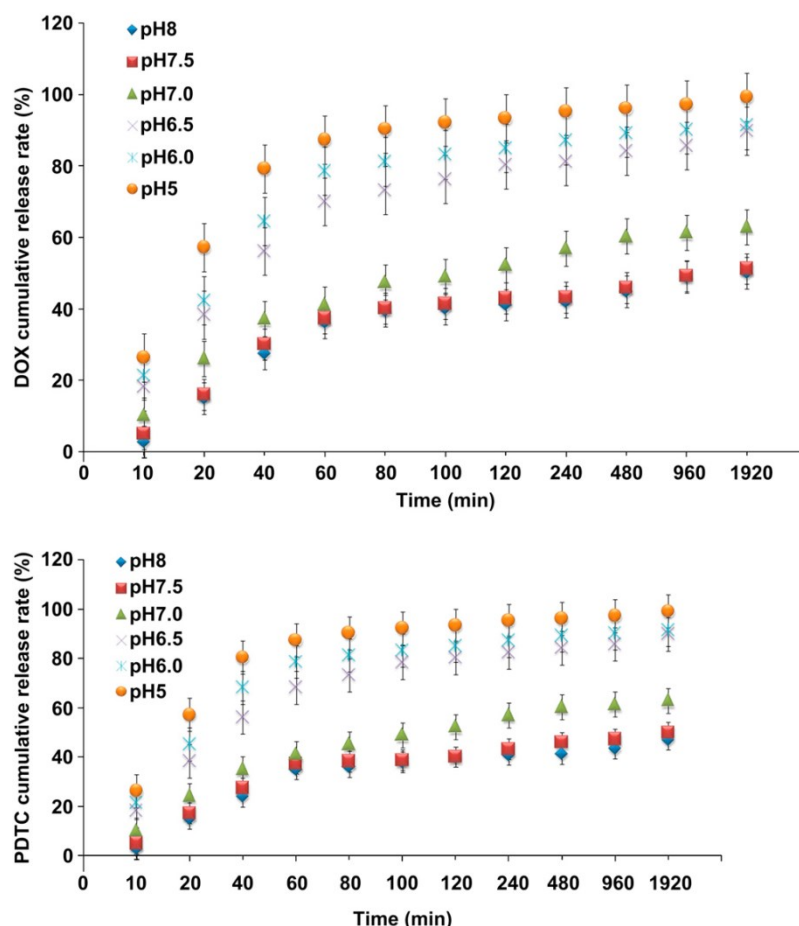


Figura 9: Perfil de liberação cumulativa de DOX e PDTC a diferentes valores de pH (Fan et al., 2010)

Relativamente ao folato e à sua função na captação dos fármacos pelas células avaliou-se a citotoxicidade manifestada pelos fármacos livres, veiculados em micelas de quitosano (CS) e em micelas de FA-CS, nas mesmas condições, tendo os resultados revelado que as micelas de FA-CS apresentam uma concentração inibitória mínima (IC_{50}) duas vezes mais baixa que as IC_{50} manifestadas quer pela DOX e PDTC livres, quer incorporados em micelas de CS, indicando que os níveis de agente quimioterapêutico presentes no interior das células cancerígenas estão aumentados quando veiculados pelas micelas com folato na sua constituição, levando assim a um maior efeito terapêutico. Por fim, para analisar a função sensibilizante do PDTC à DOX, contrapuseram-se micelas de FA-CS carregadas apenas com DOX e carregadas com uma associação de DOX com PDTC. Foi, então, avaliada a citotoxicidade manifestada por ambas, tendo-se verificado uma percentagem de células viáveis menor aquando da sua sujeição à associação de agentes terapêuticos, como podemos observar na figura 10,

o que revela que o PDTC potencia a ação da DOX, aumentando a eficácia do tratamento (Fan et al., 2010).

Assim, podemos concluir que a sensibilidade das micelas ao pH, a capacidade que o folato oferece às micelas para que estas penetrem no espaço intracelular e aí libertem os fármacos e a sensibilização exercida pelo PDTC nas células cancerígenas para que a DOX exerça a sua função com maior eficácia, são medidas viáveis e bastante úteis no tratamento da doença oncológica, na medida em que otimizam o tratamento potenciando a ação farmacológica dos agentes terapêuticos e reduzindo a toxicidade e a resistência aos fármacos.

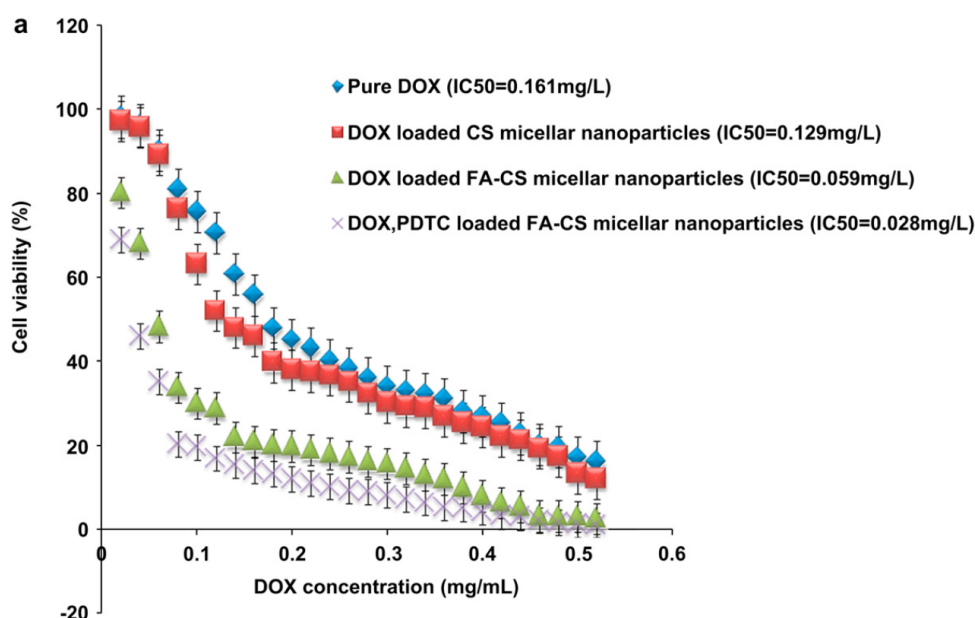


Figura 10: Percentagem de células viáveis após exposição (48 h a 37°C) à DOX pura, associada com PDTC, na forma livre e carregada em micelas de FA-CS, a diferentes concentrações (Fan et al., 2010)

3.2.2. Micelas sensíveis à temperatura

Para além das micelas sensíveis ao pH, outros tipos de micelas sensíveis a estímulos são capazes de vetorizar, ativa e passivamente, agentes terapêuticos até locais convenientes, sendo as micelas sensíveis a alterações de temperatura outra das espécies com maior interesse clínico. À semelhança das micelas sensíveis ao pH, também este

tipo de nanotransportador tem particular interesse no tratamento do cancro, visando minimizar as incompatibilidades e aumentar o sucesso da terapêutica.

A utilização da temperatura enquanto estímulo para a vetorização de fármacos baseia-se na indução de um aumento localizado da temperatura (nos locais onde se quer que os agentes terapêuticos exerçam a sua ação), de modo a que as micelas transportadoras de fármacos sensíveis à temperatura libertem os mesmos apenas nos locais de interesse, em resposta à hipertermia gerada. Para que tal aconteça é necessário que os blocos de copolímeros que compõem as micelas possuam, numa ou em ambas as porções, polímeros sensíveis à temperatura, sendo mais habitual a sua presença na porção hidrofílica que compõe a superfície externa das micelas. Estes polímeros caracterizam-se por sofrer alterações nas suas características e/ou conformação quando submetidos a variações de temperatura, e estão na base desta aplicação das micelas poliméricas. Ainda relativamente aos polímeros sensíveis à temperatura utilizados na composição deste tipo de micelas, estes podem ser classificados em dois tipos: os polímeros que precipitam abaixo da temperatura crítica de dissolução máxima (TCDM) e os que precipitam acima da temperatura crítica de dissolução mínima (TCDm), sendo que os que manifestam maior interesse para a utilização em micelas sensíveis à temperatura são os que se tornam imiscíveis em água quando expostos a uma temperatura superior à TCDm (Nakayama et al., 2014).

O fundamento da veiculação de fármacos com recurso a micelas sensíveis à temperatura baseia-se no facto destes sistemas serem constituídos por um núcleo hidrofóbico, onde são carregados os fármacos, e uma superfície externa hidrofílica, que estabiliza a estrutura da micela, constituída por polímeros que são miscíveis em água quando expostos a temperaturas abaixo da sua TCDm, mas que sofrem uma agregação e consequente precipitação quando sujeitos a temperaturas acima da sua TCDm, originando a desintegração da superfície externa hidrofílica da micela e induzindo a libertação do fármaco. Assim, consegue-se que os agentes terapêuticos sejam veiculados de uma forma estável, no interior das micelas, na circulação sanguínea e que sejam libertados, em quantidades suficientes, nos locais alvo, quando submetidos a temperaturas mais elevadas que a sua TCDm, sendo essa hipertermia induzida localmente (Nakayama et al., 2014).

Com base no mecanismo anteriormente visto e de forma a tornar este método exequível no tratamento de doenças, torna-se essencial estudar os polímeros a escolher para a formulação das micelas, bem como as TCDm associadas aos mesmos. Uma vez

que a temperatura normal do organismo humano é de cerca de 37°C, o valor da TCDm dos polímeros a utilizar deve ser ligeiramente superior a esse valor, devendo rondar os 40°C, de forma a garantir a veiculação estável dos fármacos no interior das micelas durante a circulação sanguínea e que não seja necessário submeter o organismo a níveis de temperatura intoleráveis para desencadear a libertação dos agentes terapêuticos. Assim sendo, a modulação da TCDm dos polímeros a utilizar é um passo essencial na aplicação desta estratégia de vetorização e para que a modulação da TCDm seja correta, torna-se necessário conhecer os fatores que a fazem variar (Nakayama et al., 2014):

Quantidade de espécies hidrofóbicas: quanto maior for a quantidade proporcional de espécies hidrofóbicas numa micela, menor vai ser a TCDm da mesma (Nakayama & Okano, 2005);

Massa molecular dos polímeros sensíveis à temperatura: quanto maiores forem as cadeias que compõem os polímeros sensíveis à temperatura inseridos na estrutura micelar, maior vai ser a TCDm da mesma (Nakayama & Okano, 2005).

As micelas poliméricas sensíveis à temperatura têm ainda, à semelhança das micelas sensíveis ao pH, a capacidade de vetorizar os agentes terapêuticos até ao espaço intracelular. Após chegar aos tecidos alvo, onde se verifica uma temperatura superior à sua TCDm, as micelas vão perder a sua superfície externa hidrofílica, resultando numa estrutura mais hidrofóbica que vai estabelecer interações hidrofóbicas com as células tumorais, mediante as quais os fármacos entram no interior das células (Yang et al., 2007).

A utilização da temperatura enquanto estímulo à libertação de fármacos por parte das micelas sensíveis é uma metodologia que apresenta grandes vantagens ao processo clínico. Desde logo o facto de poder ser aplicada numa vasta gama de tipos de cancro, de ser uma técnica de fácil aplicação, de controlo fácil e preciso e com poucos efeitos adversos associados. Para além de desencadear a libertação de fármacos, o aumento da temperatura vai também aumentar a permeabilidade vascular na zona em hipertermia, levando a que haja uma maior distribuição dos fármacos nestes locais. Referindo, uma vez mais, o tratamento do cancro, é sabido que o aumento da temperatura tem influência nas funções biológicas das células cancerígenas, interferindo com o seu desenvolvimento e crescimento, particularidade esta que pode funcionar em associação com as micelas sensíveis à temperatura no tratamento de doenças oncológicas (Nakayama et al., 2014).

Para comprovar a eficácia e as mais-valias que as micelas sensíveis à temperatura trazem ao tratamento de doenças, de entre as quais se destaca o cancro, vários têm sido os estudos desenvolvidos com demonstrações de resultados bastante animadores. O estudo realizado por Liu, Tong e Yang (2005) procurou demonstrar o efeito da DOX, quando veiculada por micelas sensíveis à temperatura, no tratamento do cancro da mama. Para tal, foram usadas micelas sensíveis à temperatura constituídas por blocos de copolímeros de poli(N-isopropilacrilamida-*co*-N,N-dimetilacrilamida)-*b*-poli(ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-*b*-PLGA), para estudar a libertação da DOX, a sua distribuição em células 4T1 do cancro da mama de ratos e a citotoxicidade manifestada pela mesma, a diferentes temperaturas. Para poderem testar a sensibilidade à temperatura, a TCDm das micelas de P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-*b*-PLGA foi modulada aos 39° C, uma temperatura que permite que as micelas se mantenham estáveis à temperatura corporal normal (37° C) e que se provoque um aumento na temperatura suficiente para desencadear a libertação dos fármacos sem se tornar intolerável pelo organismo humano, conforme discutido anteriormente (Liu et al., 2005).

Os resultados deste estudo, obtidos mediante condições controladas, mostraram que ao fim de 10 horas, a quantidade de DOX libertada das micelas de P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-*b*-PLGA a 37°C, temperatura inferior à TCDm, era cerca de metade da quantidade de DOX libertada a 39,5°C, temperatura superior à TCDm, tendo as percentagens de libertação rondado os 40% e os 80%, a 37°C e a 39,5°C, respetivamente. Estes valores comprovam a sensibilidade das micelas utilizadas à temperatura. Para além disto, os resultados relativos à distribuição celular da DOX e à sua citotoxicidade, revelaram que o agente terapêutico veiculado pelas micelas de P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-*b*-PLGA, quando sujeito a uma temperatura superior à TCDm vai distribuir-se pelo núcleo e citoplasma das células 4T1 enquanto que quando submetido aos 37°C correspondentes à temperatura normal, a sua distribuição celular resume-se ao citoplasma celular. Esta distribuição, conjuntamente com a quantidade de DOX libertada, vai refletir-se no número de células 4T1 viáveis após o tratamento que, como podemos verificar na figura 11, é menor a 39,5°C que a 37°C, o que comprova, uma vez mais a sensibilidade destas micelas à temperatura (Liu et al., 2005).

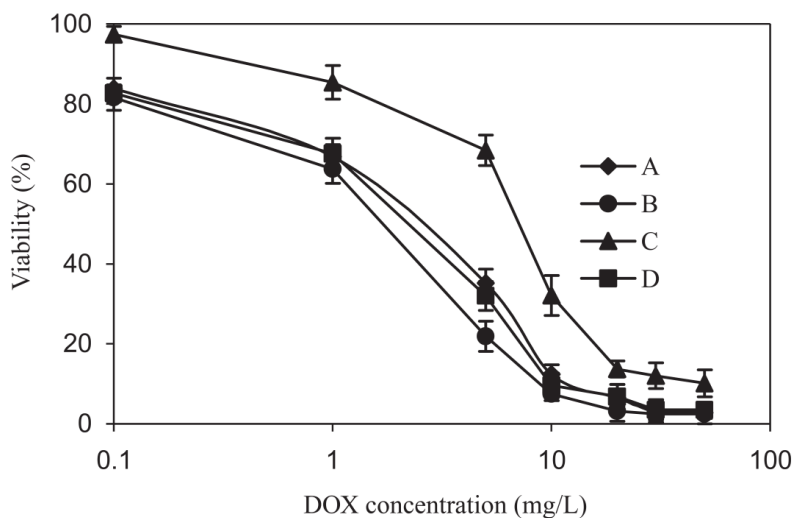


Figura 11: Percentagem de células 4T1 viáveis após exposição de 48 horas à DOX livre e carregada em micelas de P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-*b*-PLGA, a diferentes concentrações, a 37°C e 39,5°C. (A) DOX livre a 37°C; (B) DOX livre a 39,5°C; (C) DOX carregada em micelas a 37°C; (D) DOX carregada em micelas a 39,5°C (Liu et al., 2005)

Os resultados evidenciados por este estudo mostram, então, que as micelas de P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-*b*-PLGA permanecem estáveis a 37°C e que se verifica uma libertação maior e mais rápida de DOX quando se sujeitam as micelas a um estado de hipertermia, o que indicia que estes sistemas são potenciais agentes de veiculação de fármacos a utilizar no tratamento do cancro.

Um outro estudo realizado no mesmo âmbito mas um pouco mais recente e completo foi o desenvolvido por Yang et al. (2007), no qual se procurou verificar a eficácia de micelas sensíveis à temperatura na veiculação do docetaxel e a sua influência no tratamento do cancro, tendo-se recorrido, para tal, a três tipos diferentes de células humanas: células BGC823 do carcinoma gástrico; células HepG2 do carcinoma hepático; e células LoVo do adenocarcinoma colorretal. Neste estudo foram testadas micelas poliméricas de poli(N-isopropilacrilamida-*co*-acrilamida)-*b*-poli(ácido láctico) (P(IPAAm-*co*-AAm)-*b*-PDLLA), com uma TCDm de 41°C, como nanotransportador do docetaxel, um agente citotóxico utilizado no tratamento do cancro. O objetivo do estudo foi averiguar, entre outros parâmetros e à semelhança do estudo analisado anteriormente, a quantidade de fármaco libertado, perante uma temperatura normal e um estado de hipertermia, no local alvo e os índices de citotoxicidade associados ao mesmo. Para avaliar a percentagem de docetaxel libertada das micelas recorreu-se à técnica de HPLC, tendo sido recolhidas amostras sujeitas e não sujeitas a hipertermia, enquanto a

citotoxicidade foi determinada por método colorimétrico após cultura nos três tipos diferentes de células utilizados no estudo (Yang et al., 2007).

No que aos resultados diz respeito e começando pelos níveis de libertação de fármaco, a figura 12 permite concluir que, a longo prazo (40/60 horas) o docetaxel veiculado pelas micelas de P(IPAAm-co-AAm)-*b*-PDLLA e submetido a um aumento de temperatura (41°C) vai ter uma percentagem de libertação a rondar os 90% enquanto que à temperatura ambiente só se verifica a libertação de 50% de fármaco. O facto de os índices de libertação na fase inicial serem bastante similares indica que a veiculação do docetaxel nas micelas poliméricas sensíveis à temperatura é estável até chegar ao local alvo, onde se verifica o estado de hipertermia (Yang et al., 2007).

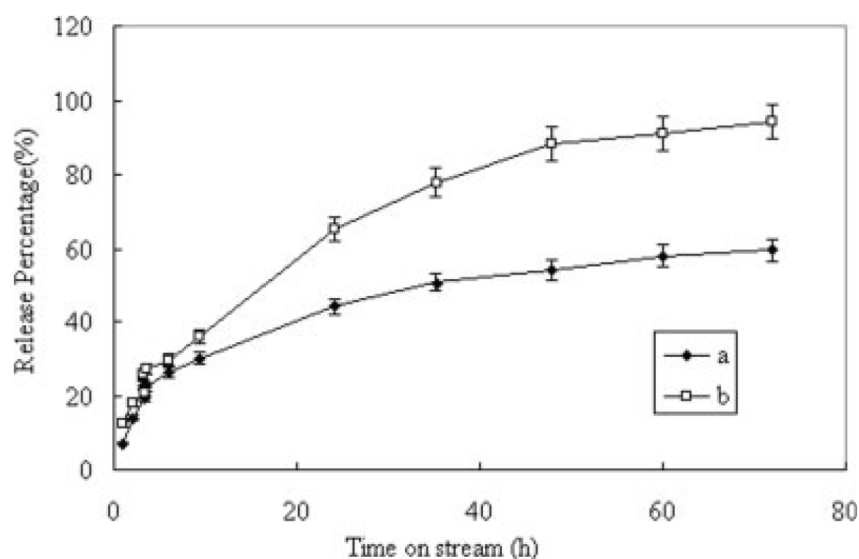


Figura 12: Perfil de libertação cumulativa do docetaxel carregado em micelas de P(IPAAm-co-AAm)-*b*-PDLLA a 37°C (a) e 43°C (b) (Yang et al., 2007)

Relativamente aos resultados obtidos na determinação da citotoxicidade do docetaxel, foi possível observar que em todos os tipos de células estudados, o efeito citotóxico manifestado pelo docetaxel livre foi maior quando submetido à temperatura de 41°C do que quando esteve sujeito à temperatura de 37°C o que evidencia a ocorrência de um sinergismo entre o agente terapêutico e a temperatura, resultando

numa potenciação do tratamento. A figura 13 mostra ainda que a citotoxicidade manifestada pelo docetaxel veiculado em micelas de P(IPAAm-*co*-AAm)-*b*-PDLLA é muito maior quando se verifica o aumento de temperatura acima da TCDm das micelas, dado que o número de células viáveis após o tratamento com o aumento de temperatura (41° C) é cerca de metade, ou menos, do número de células viáveis verificado à temperatura normal do organismo, sendo estes resultados reproduzidos em todos os tipos de células utilizados. Na figura 13 é ainda possível verificar que a citotoxicidade do docetaxel livre é semelhante à do fármaco quando veiculado em micelas de P(IPAAm-*co*-AAm)-*b*-PDLLA. Outros resultados demonstraram que quando as concentrações de docetaxel não excedem os 5 ng/ml e estamos perante condições de hipertermia, o número de células viáveis após tratamento com o agente citotóxico veiculado pelas micelas poliméricas é menor que o número de células viáveis após tratamento com o fármaco livre (Yang et al., 2007).

Perante estes resultados foi possível concluir que as micelas de P(IPAAm-*co*-AAm)-*b*-PDLLA apresentam sensibilidade à temperatura e que este método de vetorização de fármacos é eficaz na veiculação do docetaxel. Comprovou-se também que a citotoxicidade manifestada pelo fármaco veiculado pelas micelas poliméricas é semelhante à do fármaco na forma livre, quando sujeitos a temperaturas superiores à TCDm, pelo que a sua eficácia está assegurada. Neste estudo, Yang et al. (2007) concluíram ainda que o docetaxel na forma livre apresenta maior toxicidade para o organismo do que quando veiculado por meio de micelas de P(IPAAm-*co*-AAm)-*b*-PDLLA, sendo esta uma vantagem importante e diferenciadora da veiculação micelar do docetaxel, na medida em que vai minimizar os efeitos adversos associados à terapêutica. Posto isto, com este estudo podemos assumir que esta técnica, e em particular a utilização de micelas de P(IPAAm-*co*-AAm)-*b*-PDLLA, é uma potencial estratégia de vetorização de agentes terapêuticos no tratamento da doença oncológica (Yang et al., 2007)

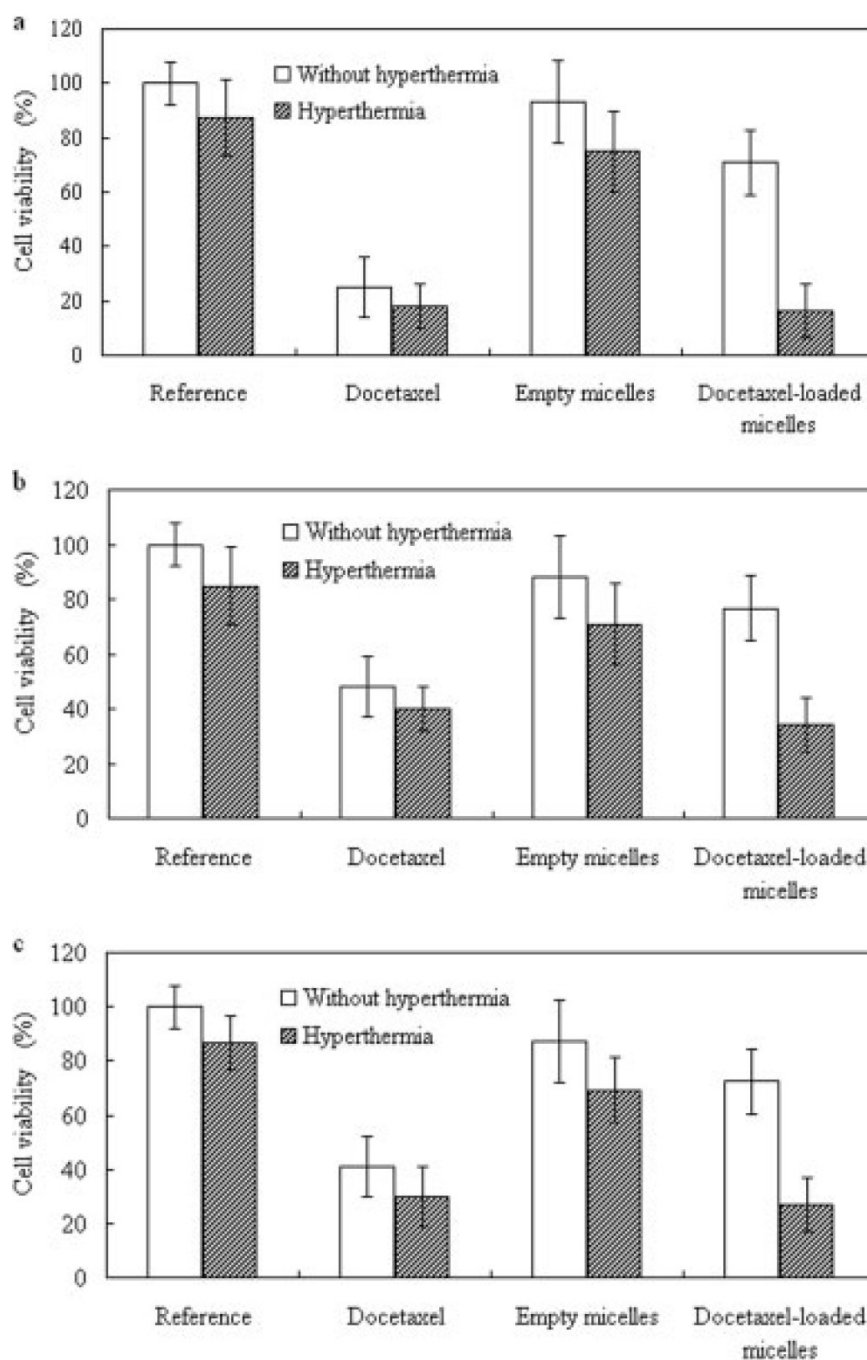


Figura 13: Percentagem de células BGC823 (a), HepG2 (b) e LoVo (c) viáveis após exposição ao docetaxel livre e veiculado em micelas de P(IPAAm-co-AAm)-*b*-PDLLA, a 37°C e 43°C (Yang et al., 2007)

3.3. *Theranostics*

Como é sabido, qualquer que seja a patologia a tratar, a eficácia e sucesso do tratamento estão diretamente dependentes de um diagnóstico adequado. Ao longo desta revisão foram analisadas as vantagens da veiculação micelar de fármacos no tratamento

de patologias delicadas, nomeadamente do cancro, tendo-se visto que para qualquer tipo de micela ou de fármaco a utilizar, é necessário conhecer as propriedades e características dos tecidos a tratar, para que se possa formular um sistema terapêutico adequado. (Liu et al., 2015)

Os *theranostics* são sistemas/partículas que combinam o tratamento e o diagnóstico, isto é, veiculam agentes terapêuticos e de diagnóstico em simultâneo, providenciando, numa administração única, ação terapêutica sobre os tecidos lesados e informação de diagnóstico (Kelkar & Reineke, 2011; Liu et al., 2015).

Devido às características inerentes aos *theranostics*, não é fácil arranjar partículas com propriedades apropriadas para desempenhar esta ação. Após vários estudos neste âmbito, concluiu-se que as nanopartículas, de entre as quais se destacam as micelas, são excelentes candidatas para tal, na medida em que a capacidade de veicular grande quantidade e variedade de agentes intrínseca às mesmas, bem como a aptidão de vetorizar estes agentes até aos locais alvo, são propriedades essenciais para se obterem *theranostics* (Kelkar & Reineke, 2011; Liu et al., 2015).

A principal vantagem inerente a estes sistemas é a capacidade que os mesmos têm de fornecer dados e imagens, de uma forma não invasiva, que permitem não só diagnosticar/monitorizar o estado da doença, mas também a atividade e eficácia dos agentes terapêuticos, oferecendo informação relativa aos seus perfis farmacocinéticos e à sua eficácia. Para além disto, o facto dos *theranostics* combinarem o tratamento e diagnóstico minimiza os erros decorrentes de diferenças na seletividade e distribuição entre os agentes terapêuticos e os agentes de diagnóstico, evitando, assim, erros de diagnóstico ou monitorização (Kelkar & Reineke, 2011).

A metodologia de ação destes sistemas é muito semelhante à da veiculação micelar de fármacos, podendo também eles serem veiculados ativa e/ou passivamente. No entanto, quando chegam ao local de ação e desempenham a sua função, os agentes de diagnóstico incorporados vão emitir um sinal que é detetado e analisado, oferecendo assim informação de diagnóstico e monitorização da patologia e da ação terapêutica dos fármacos, como mostra a figura 14. Assim sendo, a utilização de *theranostics* no tratamento do cancro e outras patologias, vai possibilitar uma monitorização, em tempo real, da resposta dos tecidos lesados à terapêutica, permitindo modular a mesma e personalizar o tratamento (Chowdhury, Schumann, Bhakta-Guha, & Guha, 2016; Kelkar & Reineke, 2011; Liu et al., 2015).

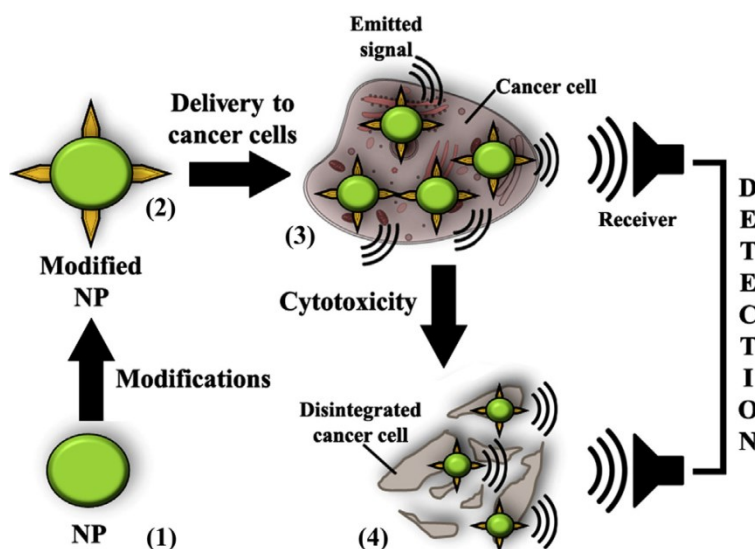


Figura 14: Modo de ação dos *theranostics* (Chowdhury et al., 2016)

Posto isto, e no sentido de comprovar na prática a eficácia e aplicação dos *theranostics* no tratamento de doenças, Liu et al. (2015) desenvolveram um estudo no qual procuraram avaliar o desempenho de micelas poliméricas, simultaneamente, no tratamento hepatocarcinoma humano e no diagnóstico e monitorização da patologia, nomeadamente a partir de imagens de ressonância magnética. Neste estudo foram produzidas micelas formadas à base de blocos de poliméricos de poli(ácido láctico)-poli(etilenoglicol)-poli(L-lisina)-ácido dietilenotriaminopentacético (PLA-PEG-PLL-DTPA) e poli(ácido láctico)-poli(etilenoglicol)-poli(L-lisina)-biotina (PLA-PEG-PLL-Biotina), as quais foram carregadas com PTX, que como já foi visto anteriormente, é um agente citotóxico utilizado no tratamento do cancro. À porção hidrofílica destas micelas foram quelados iões de gadolínio (Gd), um ião utilizado como agente de contraste em ressonâncias magnéticas, que vai funcionar, nesta situação, como o agente de diagnóstico. Para além disto, à superfície das micelas foram ainda ligados anticorpos contra a alfafetoproteína (AFP), no sentido de promover uma veiculação ativa, uma vez que estas últimas estão sobreexpressas nas células tumorais do hepatocarcinoma humano. Foram então formados os *theranostics* em estudo, as micelas seletivas carregadas com Gd/PTX (TGPM), com propriedades de diagnóstico através de ressonância magnética e veiculação ativa de fármaco, que se apresentam na figura 15 (Liu et al., 2015).

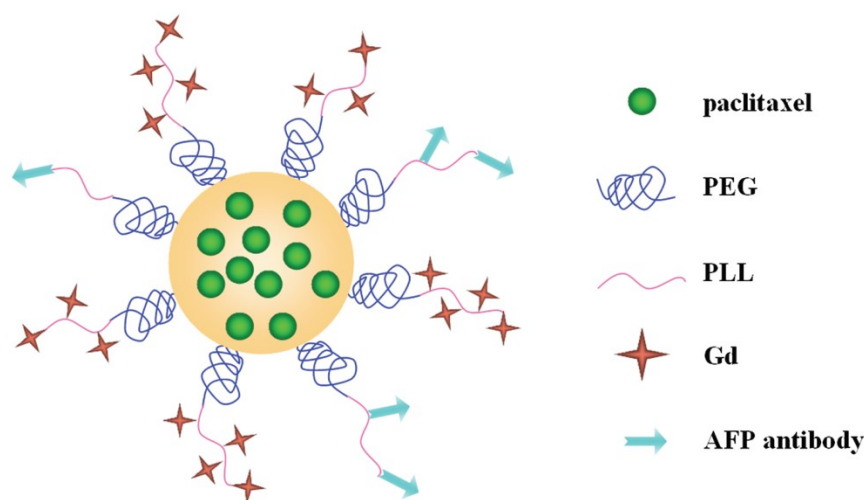


Figura 15: Estrutura de um sistema *theranostic*: micelas TGPM (Liu et al., 2015)

Para avaliar as propriedades terapêuticas e de diagnóstico das micelas de TGPM, analisou-se a presença das mesmas, com e sem anticorpos anti-AFP, no interior de células do hepatocarcinoma humano HepG2, a liberação *in vitro* de PTX, as propriedades de diagnóstico através de ressonância magnética *in vitro* e *in vivo*, a citotoxicidade e a atividade antitumoral das micelas *in vivo* (Liu et al., 2015).

A presença de micelas TGPM no interior de células HepG2 foi analisada através de técnicas de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, tendo-se testado este parâmetro em micelas possuidoras e não possuidoras de anticorpos anti-AFP na sua superfície, a diferentes concentrações e tempos de exposição. Os resultados da microscopia de fluorescência revelaram que as micelas munidas de anticorpos anti-AFP apresentavam maior intensidade de fluorescência que as micelas sem o fator de seletividade, em todas as condições estudadas. Para além destes dados, a citometria de fluxo permitiu quantificar as diferenças manifestadas pela técnica de microscopia, tendo evidenciado que a concentrações idênticas, a percentagem de micelas TGPM com anticorpos anti-AFP, no interior das células HepG2, é superior em 20% e 10% comparativamente com o valor manifestado pelas micelas desprovidas do fator de seletividade, quando a duração do tratamento foi de 0,5 e 2 horas, respetivamente (Fig. 16). Estes valores indicam que a presença de anticorpos anti-AFP na superfície das micelas confere uma seletividade importante ao agente *theranostic* (Liu et al., 2015).

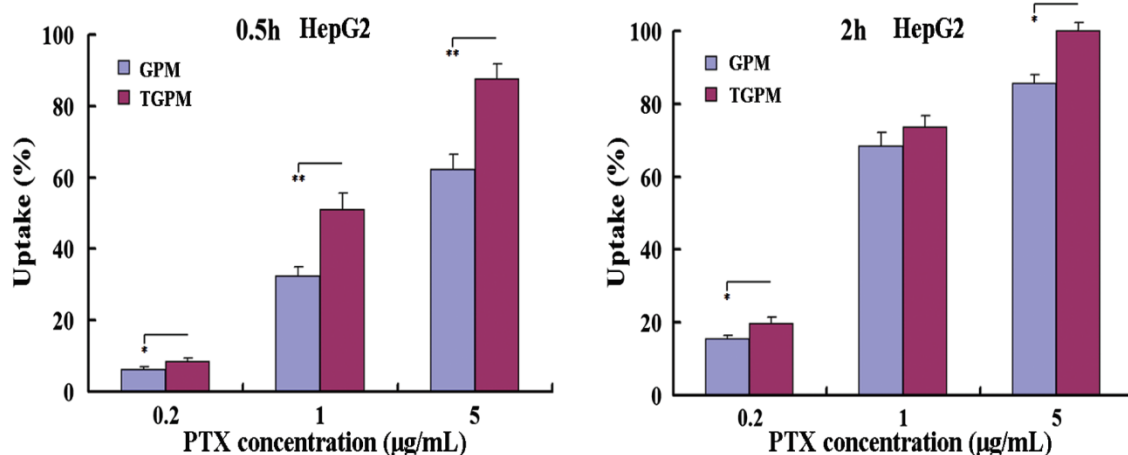


Figura 16: Percentagem de micelas com (TGPM) e sem (GPM) anticorpos anti-AFP, no interior das células HepG2, às 0,5 h e 2 h (Liu et al., 2015)

Na avaliação dos índices de libertação de PTX das micelas TGPM recorreu-se a uma técnica de diálise, aferindo-se a concentração de PTX no meio, tendo-se usado como controlo PTX veiculado em micelas TGPM desprovidas de anticorpos anti-AFP e PTX na forma livre (Taxol®). Os resultados deste teste indicaram que, ao fim de 8 horas, a concentração de PTX libertado pela forma livre era de 100% e de 75,93% e 69,91% quando veiculado em micelas TGPM sem e com anticorpos anti-AFP, respetivamente. Estes resultados indicam que a libertação do fármaco deve ocorrer através de um processo erosivo, levando a que se verifiquem menores índices de libertação nas micelas com revestimento mais complexo, dada a presença do resíduo de vetorização (Liu et al., 2015).

Na análise à capacidade das micelas TGPM de fornecer informação de diagnóstico sob a forma de imagem, recorreu-se a um aparelho de ressonância magnética (Sigma 3.0 T), tanto no teste *in vitro* como no *in vivo*. Relativamente ao teste *in vitro*, os resultados mostram que os *theranostics* em estudo apresentam uma boa capacidade para fornecer imagens de diagnóstico, pois como podemos observar na ressonância magnética (Fig. 17), o sinal emitido pelas micelas em estudo a 15 µM é semelhante ao emitido pelo controlo (Magnevist®) a 40 µM. O teste *in vivo* foi realizado em ratos aos quais foram injetadas células do hepatocarcinoma murino e os resultados ofereceram informações semelhantes aos já relatados, tendo permitido, ainda, que se fizesse uma comparação entre a duração do sinal emitido pelas micelas em estudo e pelo Magnevist®. Os resultados obtidos são reproduzidos na figura 18, que mostra que a

duração do diagnóstico fornecido pelo controlo é de menos de 1 hora, enquanto o fornecido pelas micelas TGPM é superior a 3 horas. Os resultados obtidos em ambos os testes evidenciam que o Gd presente nas micelas é um agente de contraste que fornece um diagnóstico claro, sendo por isso um excelente candidato a agente de diagnóstico a utilizar em *theranostics* (Liu et al., 2015).

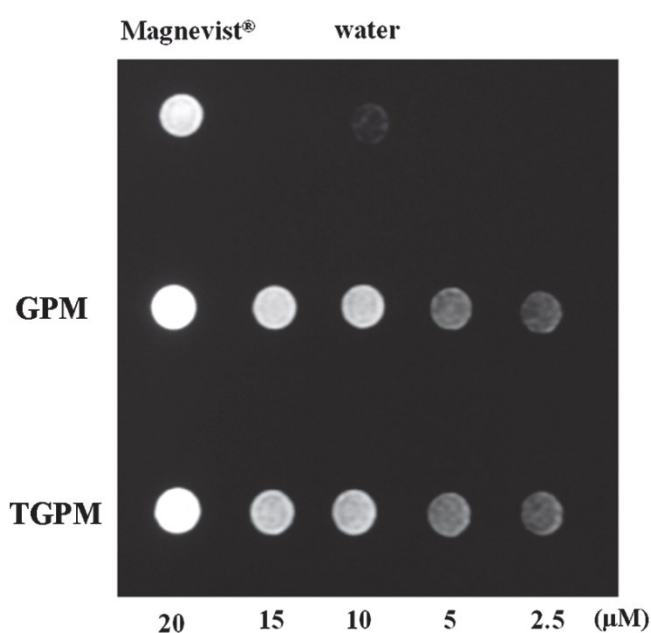


Figura 17: Ressonância magnética *in vitro* de Magnevist®, água e micelas com (TGPM) e sem (GPM) anticorpos anti-AFP (Liu et al., 2015)

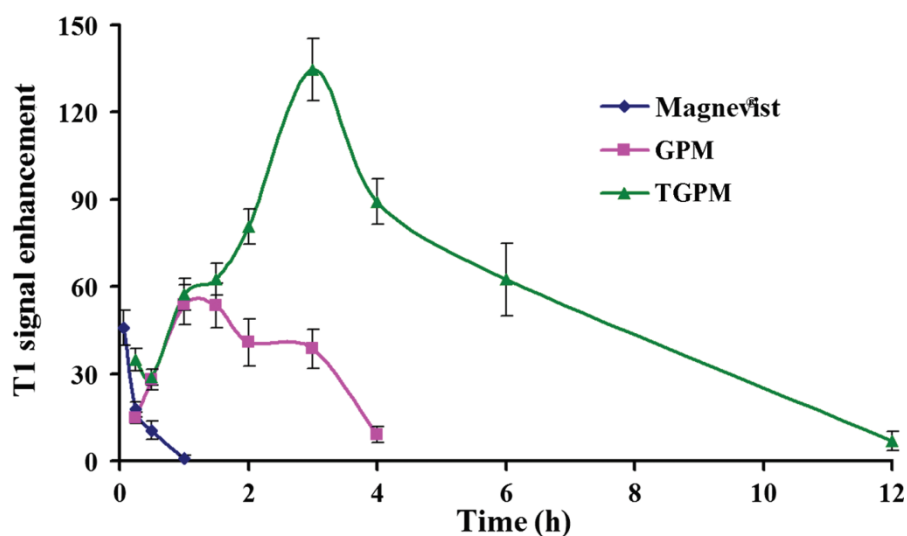


Figura 18: Intensidade e duração do sinal emitido *in vivo* pelo Magnevist® e micelas com (TGPM) e sem (GPM) anticorpos anti-AFP (Liu et al., 2015)

Para aferir a citotoxicidade manifestada pelos *theranostics* em estudo, submeteram-se células HepG2 ao tratamento com PTX na forma livre (Taxol®) e veiculado por micelas TGPM com e sem anticorpos anti-AFP, como anteriormente, a diferentes concentrações e durante diferentes tempos de exposição. Os resultados estão expressos na figura 19 e indicam que a percentagem de células HepG2 viáveis é superior no tratamento com Taxol®, quando comparado com o tratamento com o PTX veiculado em micelas, sendo que quando comparamos percentagem de células viáveis após o tratamento com as micelas com e sem o fator de seletividade, verifica-se sempre uma menor percentagem nas primeiras, o que significa que existe uma influência direta entre a seletividade das micelas e a citotoxicidade do fármaco. Os resultados mostram ainda que quando o tratamento se processa mediante as condições de máxima concentração de PTX e máxima duração de exposição, os níveis de células viáveis foram de 20%, indicando isto que se atingem níveis de citotoxicidade muito elevados. É, também, importante referir que foi testado o tratamento com micelas TGPM sem PTX, tendo os resultados revelado que não houve relevância na citotoxicidade exercida por estes agentes. Posto isto, foi possível concluir que os *theranostics* em estudo manifestam elevados níveis de citotoxicidade contra as células HepG2 do hepatocarcinoma humano, tornando-se elegíveis para o tratamento deste tipo de cancro (Liu et al., 2015).

Por fim, para analisar a atividade antitumoral, foi realizado um teste *in vivo* em ratos, aos quais foram injetadas células H22 do hepatocarcinoma murino tendo-se avaliado o efeito de uma solução salina (sem agente citotóxico), do PTX na forma livre (Taxol®) e do PTX veiculado em micelas TGPM com e sem anticorpos anti-AFP no crescimento tumoral. As doses de PTX nas amostras utilizadas não variaram ao longo do estudo nem entre elas, tendo sido feitas administrações das amostras aos dias 1, 4 e 7. Os resultados deste estudo revelaram que comparativamente com a solução salina, as amostras possuintes de PTX causaram uma inibição significativa no crescimento do tumor. Os mesmos resultados revelaram também uma inibição significativa no crescimento tumoral por parte do PTX veiculado em micelas quando comparado com o Taxol®, indicando que a atividade do PTX poderá estar aumentada quando este é vetorizado em micelas devido às vantagens de distribuição e acumulação que estes sistemas proporcionam aos fármacos que transportam, permitindo-lhes permanecer nos locais alvo, em concentrações eficazes, durante um maior período de tempo. Ainda olhando aos resultados deste teste, é possível verificar que de entre os dois sistemas que

veiculam o PTX por meio de micelas TGPM, o sistema que possui o fator de seletividade apresenta uma inibição significativamente maior do crescimento tumoral, quando comparado com as micelas TGPM sem anticorpos anti-AFP. Esta diferença poder-se-á dever ao facto de num sistema a veiculação do fármaco ocorrer exclusivamente de forma passiva e no outro que contém anticorpos ocorrer de forma passiva e ativa. Todos os resultados enunciados se encontram na figura 20 (Liu et al., 2015).

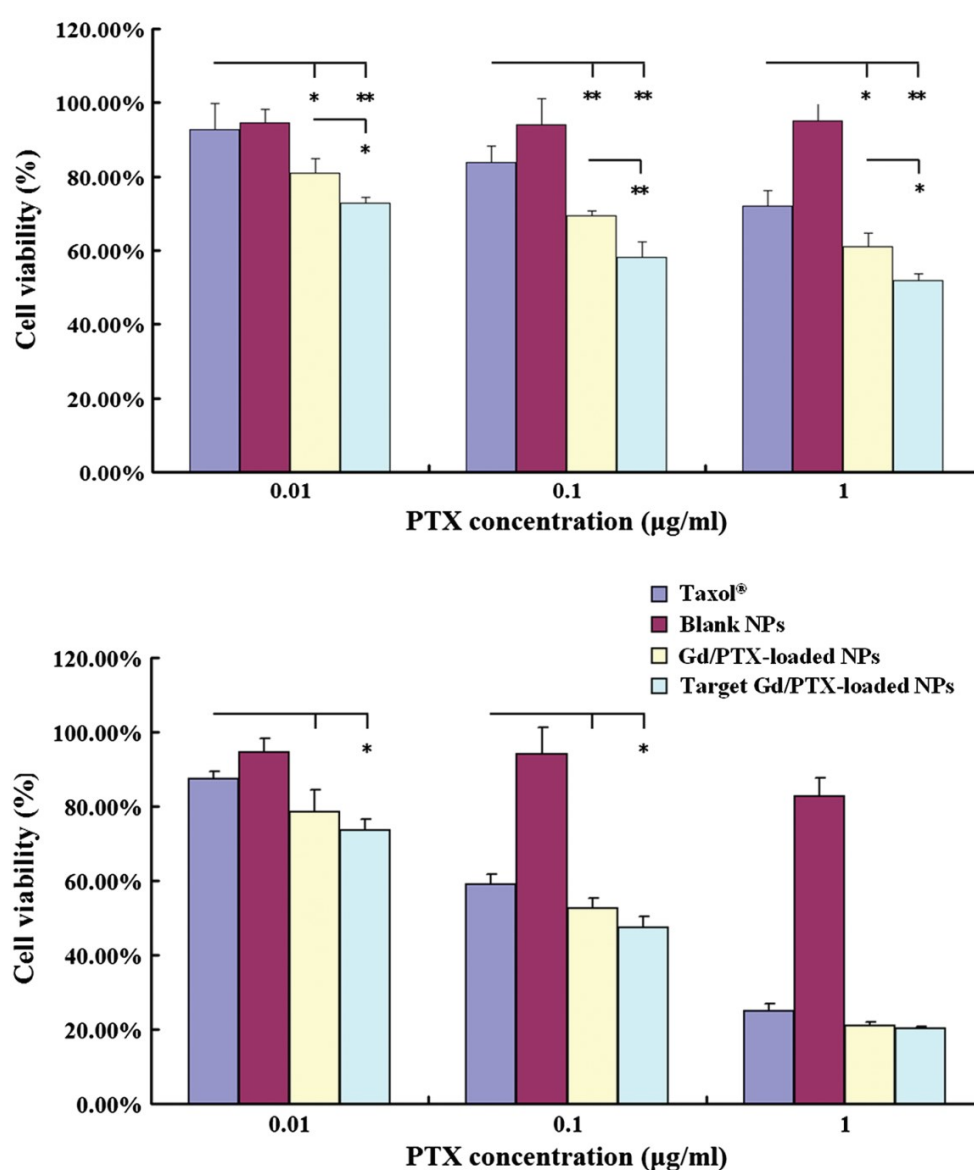


Figura 19: Percentagem de células HepG2 viáveis após exposição a micelas TGPM sem PTX e a concentrações de 0,01 µg, 0,1 µg e 1 µg de PTX livre (Taxol®) e veiculado em micelas com e sem anticorpos anti-AFP, com um tempo de exposição de 24 h (cima) e 48 h (baixo) (Liu et al., 2015)

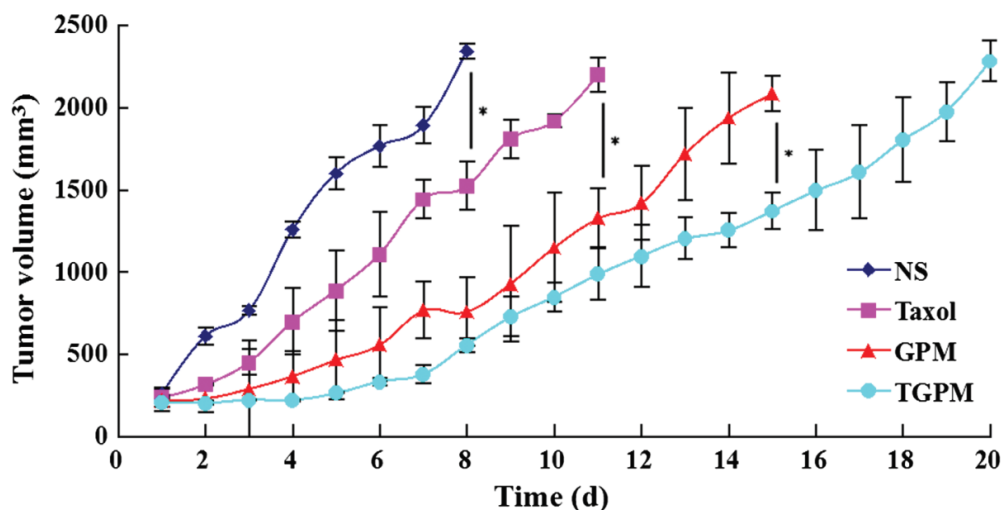


Figura 20: Índice de inibição tumoral *in vivo* pela solução salina (NS), pelo PTX na forma livre (Taxol®) e pelo PTX veiculado em micelas com (TGPM) e sem (GPM) anticorpos anti-AFP (Liu et al., 2015)

Da análise de todos os resultados do estudo concluiu-se que o agente *theranostic* TGPM proporcionou um sinal de diagnóstico intenso e duradouro e manifestou uma elevada eficácia antitumoral. Estes resultados são sugestivos de que as micelas TGPM são sistemas *theranostics* com grande potencial no tratamento e diagnóstico do hepatocarcinoma humano (Liu et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

Com vista a possibilitar uma utilização mais eficaz e mais segura da quimioterapia no tratamento do cancro, avaliou-se a aplicação dos sistemas nanométricos de veiculação de fármacos, em particular das micelas. Estes sistemas vão conferir aos fármacos vantagens importantes no sentido de minimizar os problemas associados aos mesmos e de otimizá-los, aumentando a resistência dos fármacos à eliminação hepática e renal precoce, vetorizando-os ao tumor por conta do efeito EPR e aumentando a sua solubilidade, permitindo assim que se administrem doses mais baixas e com menor frequência, aumentando a seletividade, diminuindo o risco de toxicidade e melhorando a adesão à terapêutica.

Para além das vantagens inerentes às micelas, a variedade de aplicações que estas possuem permite-lhe otimizar, ainda mais, a veiculação de fármacos já utilizados em tratamentos e utilizar novos agentes terapêuticos.

A *multi-drug therapy* é uma das aplicações das micelas mais relevantes para o tratamento do cancro, possibilitando um sinergismo de efeitos de diversos agentes terapêuticos e a superação da multirresistência a fármacos. Os resultados dos estudos de Katragadda et al. (2011), Chitkara et al. (2012) e Emami et al. (2015) evidenciaram que a veiculação simultânea de agentes terapêuticos específicos por meio de micelas poliméricas aumentou a eficácia do tratamento e reduziu a toxicidade associada ao mesmo.

Relativamente à sensibilidade a estímulos, é uma aplicação das micelas de relevância acentuada no tratamento do cancro, na medida em que possibilita, não só, a conjugação da seletividade dos fármacos veiculados com a libertação em quantidades apropriadas dos mesmos, mas também, em certos casos, uma veiculação dos fármacos para o espaço intracelular, maximizando a ação terapêutica dos fármacos e reduzindo a toxicidade periférica resultante do tratamento. Os estudos desenvolvidos por Gao et al. (2005) e Fan et al. (2010) demonstraram as mais-valias que as micelas sensíveis ao pH oferecem ao tratamento da doença oncológica, nomeadamente os elevados níveis de fármaco que estas veiculam aos locais de ação e ao espaço intracelular. Num âmbito ligeiramente diferente, os resultados provenientes dos estudos de Liu et al. (2005) e Yang et al. (2007) evidenciaram, não só, que as micelas sensíveis à temperatura promovem a libertação de fármacos em quantidades e nos locais adequados, mas também que a temperatura tem influência nas funções celulares dos

tecidos tumorais, possibilitando uma combinação de fatores que pode aumentar a eficácia dos tratamentos.

Por último, o *theranostic* é outra das aplicações das micelas, caracterizada pela capacidade de exercer um efeito terapêutico ao mesmo tempo que fornece informação de diagnóstico. O estudo desenvolvido por Liu et al. (2015) comprovou a eficácia citotóxica das micelas em simultâneo com o fornecimento de dados que possibilitam a monitorização, em tempo real, dos tecidos lesados e da ação terapêutica.

Apesar de não existir ainda nenhum medicamento comercializado com esta tecnologia, o crescente número de estudos desenvolvidos neste âmbito e os resultados por eles evidenciados, indicam que o uso de micelas na veiculação de fármacos é uma estratégia bastante aliciante e de eficácia comprovada no tratamento do cancro. Para o futuro perspectiva-se a utilização deste sistema de veiculação de fármacos num tratamento da doença oncológica cada vez mais personalizado para cada doente.

5. BIBLIOGRAFIA

- American Cancer Society. (2015). Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. *American Cancer Society*, 1–64.
- American Cancer Society. (2016). Cancer Treatment. *Cancer Treatment & Survivorship Facts & Figures*, 1–44.
- Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., & Vadhanam, M. V. (2013). Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Letters*, 334(1), 133–141. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.032>
- Attwood, D., & Florence, A. T. (2012). *FASTtrack: Physical Pharmacy* (Second Edi). London: Pharmaceutical Press.
- Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T., & Tan, W. (2012). Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*, 7(8), 1253–1271. <http://doi.org/10.2217/nmm.12.87>
- Chitkara, D., Singh, S., Kumar, V., Danquah, M., Behrman, S. W., Kumar, N., & Mahato, R. I. (2012). Micellar Delivery of Cyclopamine and Gefitinib for Treating Pancreatic Cancer. *Molecular Pharmaceutics*, 9(8), 2350–2357. <http://doi.org/10.1021/mp3002792>
- Chowdhury, M. R., Schumann, C., Bhakta-Guha, D., & Guha, G. (2016). Cancer nanotheranostics: Strategies, promises and impediments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 291–304. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.035>
- Dikmen, G., Genç, L., & Güney, G. (2011). Advantage and Disadvantage in Drug Delivery Systems, 5, 468–472.
- Emami, J., Rezazadeh, M., Rostami, M., Hassanzadeh, F., Sadeghi, H., Mostafavi, A., ... Lavasanifar, A. (2015). Co-delivery of paclitaxel and α -tocopherol succinate by novel chitosan-based polymeric micelles for improving micellar stability and efficacious combination therapy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(7), 1137–1147. <http://doi.org/10.3109/03639045.2014.935390>
- Fan, L., Li, F., Zhang, H., Wang, Y., Cheng, C., Li, X., ... Zhang, S. (2010). Co-delivery of PDTC and doxorubicin by multifunctional micellar nanoparticles to achieve active targeted drug delivery and overcome multidrug resistance.

- Biomaterials*, 31(21), 5634–5642.
<http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.066>
- Gadde, S. (2015). Multi-drug delivery nanocarriers for combination therapy. *Med. Chem. Commun.*, 6, 1916–1929. <http://doi.org/10.1039/C5MD00365B>
- Gao, Z. G., Lee, D. H., Kim, D. I., & Bae, Y. H. (2005). Doxorubicin loaded pH-sensitive micelle targeting acidic extracellular pH of human ovarian A2780 tumor in mice. *Journal of Drug Targeting*, 13(7), 391–7. <http://doi.org/10.1080/10611860500376741>
- Gaucher, G., Dufresne, M. H., Sant, V. P., Kang, N., Maysinger, D., & Leroux, J. C. (2005). Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 109(1–3), 169–188. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.034>
- Gillet, J. P., & Gottesman, M. M. (2010). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. In J. Zhou (Ed.), *Multi-Drug Resistance in Cancer* (pp. 47–76). Totowa, NJ: Humana Press. http://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6_4
- Gothwal, A., Khan, I., & Gupta, U. (2016). Polymeric Micelles: Recent Advancements in the Delivery of Anticancer Drugs. *Pharmaceutical Research*, 33(1), 18–39. <http://doi.org/10.1007/s11095-015-1784-1>
- Gupta, S. C., Sundaram, C., Reuter, S., & Aggarwal, B. B. (2010). Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10–12), 775–787. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.05.004>
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–33. <http://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Kataoka, K., Harada, A., & Yu, N. (2001). Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 113–131. [http://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00124-1](http://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00124-1)
- Katragadda, U., Teng, Q., Rayaprolu, B. M., Chandran, T., & Tan, C. (2011). Multi-drug delivery to tumor cells via micellar nanocarriers. *International Journal of*

- Pharmaceutics*, 419(1–2), 281–286. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.07.033>
- Kedar, U., Phutane, P., Shidhaye, S., & Kadam, V. (2010). Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(6), 714–729. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2010.05.005>
- Kelkar, S. S., & Reineke, T. M. (2011). Theranostics: Combining imaging and therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 22(10), 1879–1903. <http://doi.org/10.1021/bc200151q>
- Li, S. D., & Huang, L. (2008). Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 496–504. <http://doi.org/10.1021/mp800049w>
- Liu, S. Q., Tong, Y. W., & Yang, Y. Y. (2005). Incorporation and in vitro release of doxorubicin in thermally sensitive micelles made from poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide-co-glycolide) with varying compositions. *Biomaterials*, 26(24), 5064–5074. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.030>
- Liu, Y., Li, J., Liu, F., Zhang, L., Feng, L., Yu, D., & Zhang, N. (2015). Theranostic polymeric micelles for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(4), 613–622. <http://doi.org/10.1166/jbn.2015.1945>
- Malik, M. A., Wani, M. Y., & Hashim, M. A. (2012). Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials. 1st Nano Update. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(4), 397–417. <http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.027>
- Mukerjee, P. (1978). Formation and Some Properties of Micelles. *Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie*, 82(9), 931–937. <http://doi.org/10.1002/bbpc.19780820944>
- Nakayama, M., Akimoto, J., & Okano, T. (2014). Polymeric micelles with stimuli-triggering systems for advanced cancer drug targeting. *Journal of Drug Targeting*, 22(7), 584–599. <http://doi.org/10.3109/1061186X.2014.936872>
- Nakayama, M., & Okano, T. (2005). Polymer terminal group effects on properties of thermoresponsive polymeric micelles with controlled outer-shell chain lengths. *Biomacromolecules*, 6(4), 2320–2327. <http://doi.org/10.1021/bm050232w>
- Oerlemans, C., Bult, W., Bos, M., Storm, G., Nijsen, J. F. W., & Hennink, W. E.

- (2010). Polymeric micelles in anticancer therapy: Targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical Research*, 27(12), 2569–2589. <http://doi.org/10.1007/s11095-010-0233-4>
- Sain, N., Krishnan, B., Ormerod, M. G., De Rienzo, A., Liu, W. M., Kaye, S. B., ... Jackman, A. L. (2006). Potentiation of paclitaxel activity by the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human ovarian carcinoma cell lines with high levels of activated AKT. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(5), 1197–1208. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0445>
- Sawai, A., Chandarlapaty, S., Greulich, H., Gonen, M., Ye, Q., Arteaga, C. L., ... Solit, D. B. (2008). Inhibition of Hsp90 down-regulates mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and sensitizes EGFR mutant tumors to paclitaxel. *Cancer Research*, 68(2), 589–596. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1570>
- Sezgin, Z., Yüksel, N., & Baykara, T. (2006). Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(3), 261–268. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.06.003>
- Shin, H. C., Alani, A. W. G., Rao, D. A., Rockich, N. C., & Kwon, G. S. (2009). Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs. *Journal of Controlled Release*, 140(3), 294–300. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.04.024>
- Thipparaboina, R., Chavan, R. B., Kumar, D., Modugula, S., & Shastri, N. R. (2015). Micellar carriers for the delivery of multiple therapeutic agents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 291–308. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.046>
- Torchilin, V. P. (2007). Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical Research*, 24(1), 1–16. <http://doi.org/10.1007/s11095-006-9132-0>
- Yan, L., & Li, X. (2016). Biodegradable Stimuli-Responsive Polymeric Micelles for Treatment of Malignancy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(3), 227–236. <http://doi.org/10.2174/138920101703160206142821>
- Yang, M., Ding, Y., Zhang, L., Qian, X., Jiang, X., & Liu, B. (2007). Novel

thermosensitive polymeric micelles for docetaxel delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81A(4), 847–857. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.31129>

Yokoyama, M. (2011). Clinical Applications of Polymeric Micelle Carrier Systems in Chemotherapy and Image Diagnosis of Solid Tumors. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 3(4), 151–158. <http://doi.org/10.1016/j.jecm.2011.06.002>